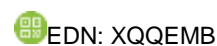




Научная статья
4.3.3 – Пищевые системы (технические науки)
УДК637.03

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014



ПОЛИПЕПТИД МОЛОЗИВА КОРОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ИНГРЕДИЕНТ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Сергей Леонидович Тихонов¹, Ирина Михайловна Чернуха²

¹ Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия

² Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, Москва, Россия

¹ tihonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

² imcher@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4298-0927>

Аннотация. Белок молозива коров и его фракции являются ценными источниками биоактивных пептидов с противовирусной активностью, что ценно для разработки новых пищевых продуктов профилактического назначения. Авторами проведены исследования по изучению влияния полипептида, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров, на интеграцию лентивирусных частиц в геном и проникновение в мембрану клеток. Полипептид, молекулярная масса которого составляет 18 кДа, состоит из 49 аминокислот. В качестве модельного объекта, на котором изучена противовирусная активность данного полипептида (трТ), были использованы клеточные линии С6 и НЕК 293Т. Анализ 2D- и 3D-пространственной структуры полипептида показал, что аминокислотные последовательности исследуемых образцов пептидов формируют вторичные структуры – преимущественно альфа-спираль. Изоэлектрическая точка полипептида находится в сильнощелочной среде (11,7), уровень гидрофильности соответствует +48,34 Ккал*моль⁻¹. Высокая гидрофильность защищает полипептид от опсонизации фаго- и энцитоза. Трехмерная модель трТ позволила установить, что он обладает высокой химической активностью, так как его заряд (+6), что способствует усилению взаимодействия с атомами клетки и лизису вирусных ДНК и РНК. Полипептид трТ снижает эффективность трансдукции лентивирусных частиц на 81 %. Интенсификация проникновения вируса через мембрану значительно снизилась, о чем свидетельствует снижение общего количества GFP внутри клетки. Статистическая обработка подтвердила, что при культивировании клеток при температуре 37 °С в значительной степени уменьшилось общее количество GFP внутри клетки при заражении вирусом. Полученные данные позволяют рекомендовать использовать исследуемый полипептид трТ в качестве функционального ингредиента в составе специализированной пищевой продукции для профилактики вирусных инфекций. Однако необходимо учитывать, что существует определенный пробел в знаниях в отношении токсичности, аллергенности, стабильности, биодоступности и эффективности биопептидов в составе продуктов специализированного назначения, особенно в экспериментах *in vivo*, что свидетельствует о необходимости дополнительных исследований.

Ключевые слова: молочный белок, трипсин, ферментативный гидролизат, молозиво коров, биологически активные пептиды, противовирусная активность, интеграция вируса в геном, проникновение вируса через мембрану клетки, продукты специализированного назначения.

Для цитирования: Тихонов С. Л., Чернуха И. М. Полипептид молозива коров – перспективный функциональный ингредиент специализированной пищевой продукции для профилактики вирусных инфекций // Ползуновский вестник. 2023. № 1. С. 114–122. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014. EDN: <https://elibrary.ru/XQQEMB>.

COW COLOSTRUM POLYPEPTIDE IS A PROMISING FUNCTIONAL INGREDIENT IN THE COMPOSITION OF SPECIALIZED FOOD PRODUCTS FOR THE PREVENTION OF VIRAL INFECTIONS

Sergey L. Tikhonov ¹, Irina M. Chernukha ²

¹ Federal Scientific Center for Food Systems. V.M. Gorbатов, Moscow, Russia

² Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russia

¹ imcher@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4298-0927>

² tikhonov75@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Abstract. Bovine colostrum protein and its fractions are valuable sources of bioactive peptides with antiviral activity. Studies have been carried out to study the biological activity of the impact of a previously unstudied polypeptide isolated from trypsin hydrolyzate of bovine colostrum on integration into the genome and penetration into the membrane of lentiviral particles. The polypeptide consists of 49 amino acids, the molecular weight of which is 18 kDa. As a model object, on which the antiviral activity of the polypeptide (mpT) was studied, cell lines C6 and HEK 293T were used. An analysis of the 2D and 3D spatial structure of the peptide made it possible to establish that the amino acid sequences of the studied samples form secondary structures, predominantly an alpha helix. The isoelectric point is in a strongly alkaline medium (11.7), the hydrophilicity level of the peptide corresponds to +48.34 Kcal*mol⁻¹. The high hydrophilicity of the isolated peptide protects it from opsonization by phage and endocytosis. A three-dimensional model of the mpT polypeptide made it possible to establish that it has a high chemical activity, since its charge is +6, which enhances interaction with cell atoms and lysis of viral DNA and RNA. The mpT polypeptide reduces the efficiency of transduction of lentiviral particles by 81 %. The intensification of virus penetration through the membrane significantly decreased, as evidenced by the decrease in the total amount of GFP inside the cell. Statistical processing confirmed that when cells were cultured at 37°C, the total amount of GFP inside the cell significantly decreased upon infection with the virus. The data obtained make it possible to recommend the use of mpT as a functional ingredient in the composition of specialized food products for the prevention of viral infections. But it must be taken into account that there is a certain gap in knowledge regarding the toxicity, allergenicity, stability, bioavailability and effectiveness of biopeptides in the composition of functional products, especially in experiments in vivo, which indicates the need for additional research.

Keywords: milk protein, trypsin, enzymatic hydrolysate, cow colostrum, biologically active peptides, antiviral activity, virus integration into the genome, virus penetration through the cell membrane, specialized products.

For citation: Tikhonov, S.L. & Chernukha, I.M. (2023). Cow colostrum polypeptide is a promising functional ingredient in the composition of specialized food products for the prevention of viral infections. *Polzunovskiy vestnik*, (1), 114-122. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2023.01.014. EDN: <https://elibrary.ru/XQQEMB>.

ВВЕДЕНИЕ

Молочный белок и его фракции являются ценными источниками биоактивных пептидов с различной функциональной активностью, такой как антитромботическая, антимикробная, противовирусная, антиоксидантная, гипотензивная, иммуномодулирующая, а иногда они обладают комплексной активностью [1]. В частности, идентифицированы биоактивные пептиды молока и молозива и обоснована перспективность их использования в функциональных продуктах питания [2].

При гидролизе молока с использованием

ферментов пепсин-панкреатин получены пептиды с антиоксидантной и антицитотоксической активностью [3]. Концентрирование и очистку пептидов осуществляют с помощью ультрафильтрации и обратнофазной жидкостной хроматографии соответственно. Авторами [3] выделено три пептида с последовательностями LEEQQQTEDEQQDQL (MW: 1860,85 Да, LL-15), YLEELHRLNAGY (MW: 1477,63 Да, YY-11) и RGLHPVPQ (MW: 903,04 Да, RQ-8), которые проявляли высокую активность по связыванию свободных радикалов и повышенную экспрессию дисмутазы и каталазы в клетку.

Ряд научных исследований сосредоточен

но на изучении белков и их фракций из второстепенных видов молочных продуктов, в частности, молозива коров, особенно на выявлении биоактивных пептидов. Однако большая часть работ посвящена исследованию высвобождения пептидов во время переваривания белков *in vivo* или *in vitro* [4]. Следовательно, все еще существуют неиспользованные и неизученные свойства молозива коров, главным образом в области биоактивных пептидов. В литературе очень мало информации о биоактивных пептидах молозива.

Одним из наиболее изученных компонентов молозива является лактоферрин, многофункциональность которого заключается в регуляции железа в организме. Средняя концентрация лактоферрина в коровьем молозиве составляет 6–8 г/л [5]. Длительное время изучается действие лактоферринов, лактоферрицинов и других производных лактоферрина в отношении антимикробной активности на молекулярном уровне [6].

Лактоферрин подавляет инфекции, вызываемые вирусами, связываясь с целевыми клетками и, в свою очередь, препятствуя росту, а также внутриклеточной репликации вирусов [7]. Пероральный прием лактоферрина показал высокую эффективность при лечении гриппа, герпеса и бактериальной инфекции [9]. Авторами [10] из лактоферрина получены антиоксидантные пептиды с молекулярной массой от 913 до 2351 Да, которые потенциально могут быть использованы в качестве ингредиента в нутрицевтиках или функциональных продуктах питания.

Авторы [11] использовали коммерческие протеазы, а именно папаин, алкалазу и химотрипсин, для гидролиза казеиновой фракции белка молока и получения биопептидов. Установлено, что пептиды, полученные с помощью гидролиза молочного белка химотрипсином, обладают более высокой антиоксидантной активностью, в то время как алкалаза и химотрипсин позволяют получить пептиды с антимикробной активностью. Следовательно, гидролизат цельного молочного белка может быть полезным при использовании в качестве нутрицевтического или функционального пищевого ингредиента.

В последние годы вызывают все больший интерес противовирусные пептиды, выделенные из природных источников, поскольку они являются высокоспецифичными и обладают активностью широкого спектра действия и минимум побочных эффектов. Так, благодаря общим структурным особенностям, включая амфипатическую структуру и катионный заряд, пептиды животного происхож-

дения участвуют в ряде различных аспектов врожденного иммунитета у млекопитающих [12].

Следует отметить, что из-за участвующих сообщений о вирусной резистентности, сопутствующих инфекциях и возникновении вирусных эпидемий, доступные противовирусные препараты демонстрируют низкую эффективность или вообще не эффективны, соответственно, производство новых методов лечения с использованием противовирусных пептидов является важной задачей [13].

Исследования пептидов, синтезированных рибосомами и пост-трансляционно-модифицированных (*ribosomallysynthesizedandpost-translationallymodifiedpeptides*, RiPPs), ввиду сильной противовирусной активности и высокой стабильности в последние несколько десятилетий достаточно актуальны. Пептиды с противовирусной активностью, особенно против вирусов, находящихся в оболочке, в настоящее время вызывают все больший интерес. RiPPs имеют ряд преимуществ перед низкомолекулярными противовирусными препаратами с точки зрения специфичности и сродства к мишеням, а также перед препаратами на основе белка за счет высокой проницаемости через мембрану клеток, стабильности и малого размера. Более того, достаточный инженерный потенциал RiPPs обеспечивает эффективный способ их оптимизации в качестве действенных противовирусных препаратов. Эти неотъемлемые преимущества подчеркивают положительные терапевтические перспективы использования RiPPs в лечении вирусных инфекций [14].

Количество пептидов с противовирусным действием ограничено, однако такие пептиды уже продемонстрировали огромный потенциал противовирусного эффекта и могут быть доступными в составе пищевой продукции [15].

Пептиды являются перспективным противовирусным агентом, способным действовать на более чем одно вирусное семейство [16]. Такие пептиды ингибируют проницательные неродственных вирусов в оболочки клетки, соответственно, обладают широким спектром действия, что обусловлено межфазной активностью. Эти пептиды в некоторой степени гидрофобны и амфипатичны, со склонностью взаимодействовать с межфазными зонами липидных бислоевых мембран клеток. Межфазная активность имеет прямую корреляцию с противовирусной активностью широкого спектра действия. Авторами Hoffmann et al. [17] изучена способность нескольких семейств пептидов расщепляться и нарушать при этом целостность мембраны. Пептиды

**ПОЛИПЕПТИД МОЛОЗИВА КОРОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
ИНГРЕДИЕНТ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

были протестированы на способность ингибировать множество разнообразных вирусов, покрытых оболочкой. Установлено, что различные семейства межфазно-активных пищевых пептидов вызывали сильное ингибирование всех оболочечных вирусов, протестированных в низких и субмикромольных концентрациях, значительно ниже диапазона, в котором они токсичны для клеток млекопитающих. Эти мембраноактивные пептиды блокируют поглощение и слияние с клеткой-хозяином, быстро и непосредственно взаимодействуя с вирионами, дестабилизируя вирусную оболочку и стимулируя агрегацию вируса и/или слияние межвирионной оболочки.

В связи с вышеизложенным, целью представленной работы являлось исследование воздействия пептида, выделенного из трипсинового гидролизата молозива коров, на интеграцию в геном и проникновение в мембрану лентивирусных частиц как потенциального противовирусного компонента продуктов профилактического назначения.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования является полипептид, условно названный нами mpT и состоящий из 49 аминокислотных остатков M H N N NE TN S AS NT V NHTV TPF K IS SH KNIRTR TK KNEGKA GT ILS TALT R с молекулярной массой 18 кДа. Полипептид был выделен после осаждения белков молозива коров сульфатом аммония и центрифугированием при 3900 об/мин. Согласно базе данных Mascot, опции Peptide Fingerprint («Matrix Science», США) и базе данных Protein NCBI, выделенный полипептид имеет структурное сходство с пептидом «CO950255 protein, susscrofa» биологические функции, которого не исследованы во всех направлениях.

Моделирование пространственной структуры выделенного пептида осуществляли с помощью программы молекулярного моделирования Schrodinger Maestro (США).

При определении противовирусной активности пептида в качестве модельного объекта использовали клеточные линии С6 (ATCC CCL-107™), чей пассаж не превышал 15 на время проведения экспериментальных работ, и HEK 293T (ATCC CRL-3216™), чей пассаж не превышал 20 на время проведения экспериментальных работ. Для культивирования использовали среду DMEM (Gibco, США), добавляли до конечного объема 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (Capricorn, США), 1 % Sodium Pyruvate (Gibco, США), 1 % Gluta MAX (Gibco, США), 1 % Penicillin / Streptomycin (Gibco, США). Клетки

хранили в CO₂-инкубаторе при следующих условиях: CO₂ – 5 %, влажность – 95 %. За две недели до начала проведения эксперимента клетки проверяли на наличие микоплазмы набором Myco Report (Евроген, Россия).

Далее проводили сборку лентивирусных частиц. Клетки HEK 293T рассаживали в чашку Петри диаметром 100 мм (Eppendorf, Германия). По достижении конfluence 65–70 % клетки трансфецировали плазмидами pLenti6-GFP (Addgene #35637), psPAX2 (Addgene # 12260), pVSV-G (Addgene #138479) в количестве 7 мкг, 9 мкг и 15 мкг соответственно для сборки лентивирусов. Культуральную среду заменили на 3 мл OPTI-MEM (Gibco, США). Далее клетки помещали в CO₂-инкубатор на 30 минут. За это время подготавливали пробирки со смесью pLenti6-GFP, psPAX2, pVSV-G, OPTI-MEM и Turbo Fect (Invitrogen, США), OPTI-MEM. Объемы смешиваемых компонентов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Смешиваемые компоненты и их объемы для сборки лентивирусных частиц

Table 1 - Mixable components and their volumes for the assembly of lentiviral particles

| | Плазмиды + OPTI-MEM | TurboFect + OPTI-MEM |
|-------------|--------------------------|--------------------------|
| pLenti6-GFP | 7 мкг (2 мкл) | Компонент не использован |
| psPAX2 | 9 мкг (2 мкл) | Компонент не использован |
| pVSV-G | 15 мкг (5 мкл) | Компонент не использован |
| TurboFect | Компонент не использован | 5 мкл |
| OPTI-MEM | Довести до 500 мкл | Довести до 500 мкл |

Содержимое пробирки инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, смешивали, тщательно ресуспендировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После чего во флаконы с HEK293T добавляли содержимое пробирок, флаконы помещались в инкубатор на 12 часов. Спустя 12 часов в пробирки добавляли культуральную среду. Через 48 часов среду собирали в отдельную пробирку и пропускали через фильтр 0,45 мкм. После этого фильтрат центрифугировали в центрифуге Optima XPN (Beckman Coulter, США) при ускорении 100000 g в течение 2-х часов и температуре 4 °С. Далее надосадочную жидкость убирали, а осадок в виде лентивирусных частиц растворяли в 1xPBS (pH = 7,4) и помещали в морозильную камеру при минус 80 °С. Затем проводили оценку интернализации лентивируса.

За 24 часа до эксперимента клетки линии С6 рассаживали в 12-луночный планшет в ко-

личестве 100000 на лунку. К клеткам добавляли раствор лентивирусных частиц (MOI = 50), реагент для усиления трансдукции Polybren (1000x) (Merck, США) и пептид (конечная концентрация была равна ИД50, установленной ранее). Спустя трое суток клетки обрабатывали трипсином и снимали с культуральной посуды и растворяли в PBS (pH 7,4), после чего проводили анализ интернационализации лентивируса на проточном цитометре FACSAria (BD, США). Производили отбор одиночных событий на графике FSC-H/FSC-A, затем отобранные события анализировались на графике GFP-logA/SSC-A с целью определения GFP-положительных событий, соответствующих джезикулам, проникнувших в мембрану и цитоплазму.

Следующим этапом исследования стало определение оценки взаимодействия с рецепторами для проникновения вируса в мембрану. Клетки HEK 293T рассаживали в культуральный флакон T25 (Eppendorf, Германия). По достижении конфлюэнтности 65-70 % клетки трансфецировали плазмидами pLenti-GFP и pVSV-G (Addgene #138479) в количестве 7 мкг и 15 мкг соответственно для сборки джезикул по протоколу. Культуральную среду заменили на 3 мл OPTI-MEM (Gibco, США). Далее клетки помещали в CO₂-инкубатор на 30 минут. За это время подготавливали пробирки со смесью pLenti-GFP, pVSV-G, OPTI-MEM и Turbo Fect (Invitrogen, США), OPTI-MEM (объемы и концентрации смешиваемых компонентов представлены в таблице 1). Пробирки инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Далее содержимое пробирок смешивали, тщательно ресуспендировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После чего во флаконы с HEK293T добавляли содержимое пробирок и помещали в инкубатор на 12 часов.

Через 12 часов среду заменяли на культуральную среду, после 48 часов среду собирали в отдельную пробирку и пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. После чего фильтрат центрифугировали в центрифуге OptimaXPN (Beckman Coulter, США) при 100000 об/мин в течение 2-х часов и температуре 4 °С. Далее надосадочную жидкость

убирали, а осадок в виде лентивирусных джезикул растворяли в 1xPBS при pH7,4, затем помещали в морозильную камеру при температуре минус 80 °С.

Клетки линии С6 размораживали и рассаживали в планшеты в количестве 8*10⁵ клеток на лунку. Через 24 часа к клеткам в присутствии фракции пептида добавляли лентивирусные джезикулы для оценки соединения с рецепторами клеточной мембраны клеток С6. Затем один из планшетов помещали в холодильник при температуре 4 °С, а другой – в CO₂-инкубатор. Содержимое планшетов инкубировали в течение 24 часов.

По истечении этого времени клетки с обоих планшетов обрабатывали трипсином и снимали с поверхности лунок. Снятые клетки центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 минут. После чего проводили анализ на проточном цитометре FACSAria (BD, США). Сначала проводили отбор одиночных событий на графике FSC-H/FSC-A, затем отобранные события анализировали на графике GFP-logA/SSC-A с целью определения GFP-положительных событий, соответствующих джезикулам, проникнувшим в мембрану и цитоплазму.

Результаты статистической обработки эффективности трансдукции и проникновения в цитоплазму представлены в виде столбчатой диаграммы, с указанными СО; анализ различий был сделан с помощью алгоритмов one-way ANNOVA и two-way ANNOVA соответственно. Достоверным считалось различие $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как функции полипептида mpT не изучены, одним из направлений наших исследований было моделирование пространственной структуры, т.е. количественное соотношение структурной активности (QSAR). Благодаря данному информационному инструменту можно предсказать активность молекулы на основе ее молекулярных особенностей.

На рисунках 1 и 2 представлены пространственная 2 D-структура и 3 D-структура полипептида mpT.

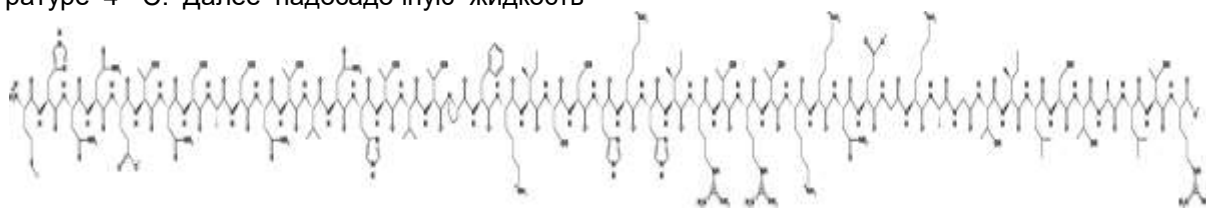


Рисунок 1 – Пространственная 2D-структура полипептида mpT

Figure 1 - Spatial 2D-structure of the mpT polypeptide

ПОЛИПЕПТИД МОЛОЗИВА КОРОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
ИНГРЕДИЕНТ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

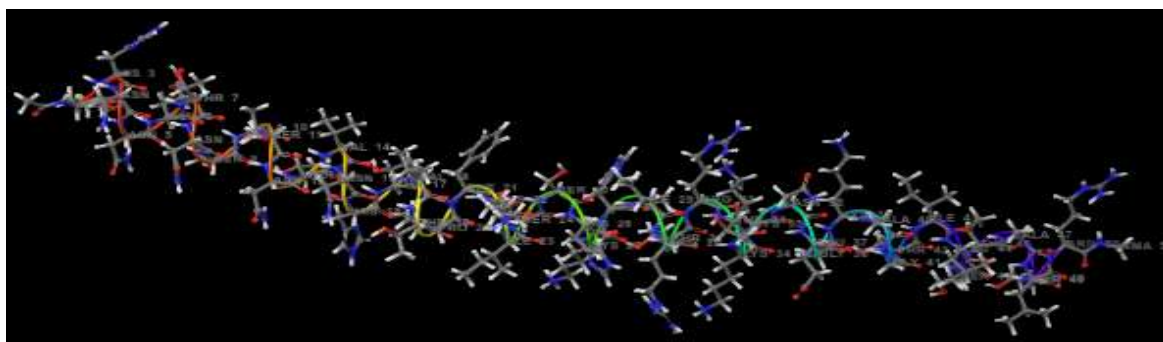


Рисунок 2 – Пространственная 3 D-структура полипептида mpT
Figure 2 - Spatial 3D-structure of the mpT polypeptide

Анализ смоделированной пространственной структуры пептида, выделенного из ферментированного молока, позволил установить, что аминокислотные последовательности исследуемых образцов формируют вторичные структуры – преимущественно альфа-спираль, так как в их составе отсутствуют в большом количестве ароматические остатки аминокислот.

Установлено, что изоэлектрическая точка полипептида находится в сильнощелочной среде (рН 11,7). Изоэлектрическая точка не зависит от количества аминокислот, а зависит от преобладания аминных или карбоксильных групп в составе пептида. Результаты моделирования структуры пептида позволили определить уровень гидрофильности, который составляет $+48,34$ ккал·моль⁻¹. Высокая гидрофильность выделенного пептида связана с большим количеством атомов водорода в молекуле, что обеспечивает ей связывание с несколькими молекулами воды. Такой эффект называют «водяное облако», он приводит к увеличению гидродинамического радиуса, способствующего

повышению растворимости и биодоступности пептида. Следует отметить, что «водяное облако» защищает пептид от защитных белков организма, например, антител, комплементов и др. Соответственно, высокая гидрофильность выделенного пептида защищает его от опсонизации фаго- и энцитоза. Полученные данные о гидрофильности пептида mpT позволяют предположить, что он может прикрепляться или проникать в клетку, минуя защиту организма «свой–чужой», что способствует повышению его способности ингибировать вирусы на поверхности или внутри клетки.

Изучение трехмерной модели пептида mpT позволило установить, что он обладает высокой химической активностью, так как его заряд равен +6, а это способствует усилению взаимодействия с атомами клетки и лизису вирусных ДНК и РНК.

В ходе проведения исследований показано, что фракция полипептида mpT снижает эффективность трансдукции лентивирусных частиц.

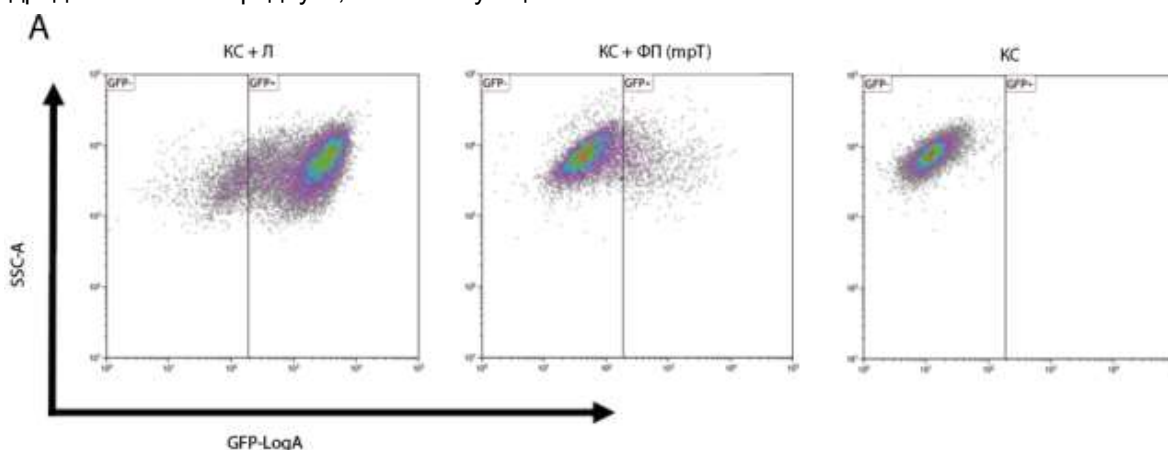


Рисунок 3 – График SSC-A/GFP-logA, где КС – культуральная среда (контроль), КС + ФП – культуральная среда с добавлением фракции mpT и лентивирусных частиц (образец), КС + Л – культуральная среда с добавлением лентивирусных частиц (положительный контроль)

Figure 3 - SSC-A/GFP-logA plot, where CM is the culture medium (control), CM + FP is the culture medium with the addition of the mpT fraction and lentiviral particles (sample), CM + L is the culture medium with the addition of lentiviral particles (positive control)

Трансдукция лентивирусных частиц показала наличие эффекта, наблюдаемого как уменьшение количества трансдуцированных клеток по наличию в них экспрессии зелёного флуоресцентного белка (Greenfluorescentprotein, GFP). Схожее расположение событий относительно оси SSC-A (рисунок 3) в ходе всего анализа указывает на возможность сопоставления полученных данных.

Эффективность трансдукции в присутствии пептида в сравнении с контролем уменьшилась на 81 % ($p < 0,0001$, рисунок 4).

Полученные данные согласуются с исследованиями Vanzolini et al. [18], доказавшими, что противовирусные пептиды обычно действуют внутриклеточно, например, на биосинтез белка или репликацию ДНК, и могут влиять на несколько этапов жизненного цикла вируса, начиная от взаимодействия вирусных рецепторов с клетками и заканчивая почкованием.

Таким образом, с помощью проточной цитометрии был проанализирован эффект проникновения в мембрану собранных джезиков,

что позволяет оценить исследуемый эффект на основании детекции GFP сигнала.

В присутствии полипептида mpT эффективность проникновения значительно уменьшилась, что следует из графиков SSC-A/GFP-logA (рисунок 5).

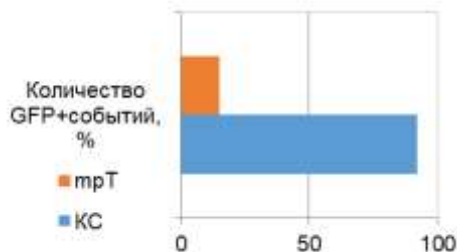


Рисунок 4 – Статистическая обработка количества GFP+ клеток ($kT=15,72 \pm 4,176$, $T1.1 = 52,17 \pm 3,868$, $KS = 90,40 \pm 2,476$), где KC – культуральная среда с добавлением лентивирусных частиц ($p < 0,0001$)

Figure 4 - Statistical processing of the number of GFP+ cells ($kT=15.72 \pm 4.176$, $T1.1=52.17 \pm 3.868$, $KS=90.40 \pm 2.476$), where KS is the culture medium with the addition of lentiviral particles ($p < 0,0001$)

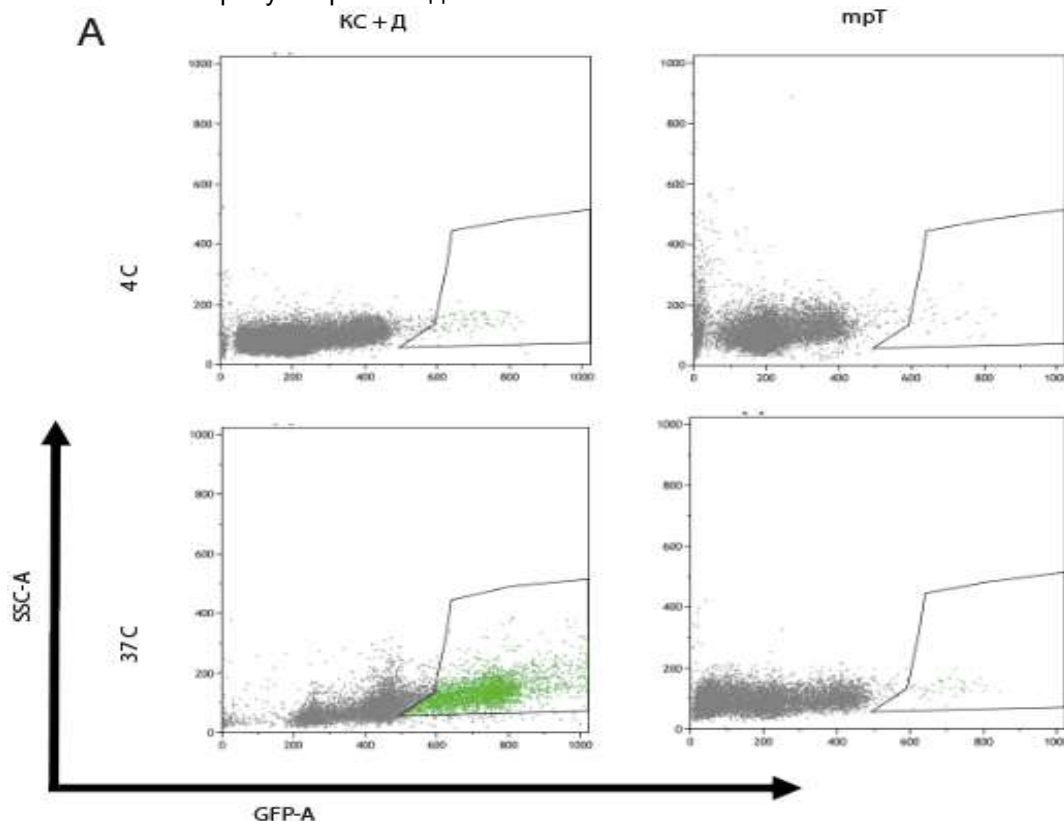


Рисунок 5 – Динамика связывания с рецепторами и проникновения в мембрану лентивирусных джезиков, выявленная с помощью метода проточной цитометрии благодаря детекции GFP-сигнала, где mpT – фракции пептидов, KC – культуральная среда, KC + Д – культуральная среда с лентивирусными джезикалами

Figure 5 - Dynamics of binding to receptors and penetration into the membrane of lentiviral vesicles using the flow cytometry method due to the detection of the GFP signal, where mpT - peptide fractions, CM is the culture medium, CM + D is the culture medium with lentiviral vesicles

**ПОЛИПЕПТИД МОЛОЗИВА КОРОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
ИНГРЕДИЕНТ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Статистическая обработка подтвердила, что связывание лентивирусов с рецепторами клетки при инкубировании с фракциями пептидами при температуре 4 °С не происходит. При культивировании клеток при температуре 37 °С в значительной степени уменьшилось общее количество GFP внутри клетки, вследствие чего можно предположить, что пептид ингибирует проникновение вируса через мембрану в клетку (рисунок 6).

Можно предположить, что противовирусные свойства пептида mpT связаны с наличием в исходном молозиве белка лактоферрина (Lf), обладающего противовирусными свойствами и расщепляющегося в результате ферментативного гидролиза до пептидов-лактоферрицинов (Lfcins) и других пептидов, способных инактивировать вирусы.

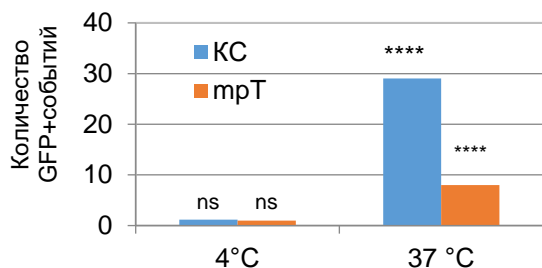


Рисунок 6 – Сравнение эффективности проникновения джезикул в мембрану клетки, где mpT – фракции пептидов, KC – культуральная среда (ns – незначительные отличия, $p > 0,05$; **** $p < 0,0001$, статистическая обработка методом two-way ANNOVA)

Figure 6 - Comparison of the efficiency of the penetration of the vesicles into the cell membrane, where mpT - fraction of peptides, KC - culture medium (ns - no significant differences, $p > 0.05$; **** - $p < 0.0001$, statistical processing by two- way ANNOVA)

Полученные данные согласуются с исследованиями Zarzosa-Moreno et al. [19], в которых доказано, что в молозиве имеются молекулы (Lf), Apo-Lf, не содержащие железо, но способные захватывать трехвалентное железо, блокируя при этом доступность железа хозяина для патогенов.

Apo-Lf обладает бактерицидным действием, в основном, благодаря своему взаимодействию с микробной поверхностью, вызывая повреждение мембраны и изменяя ее проницаемость. Lf может ингибировать проникновение вируса путем связывания с клеточными рецепторами или вирусными частицами. Lf также способен противостоять различным механизмам заражения и проникновения в организм хозяина, вырабатываемым микробными патогенами, таким как прилипание, колонизация,

инвазия, образование биопленок и выработка факторов вирулентности, таких как протеазы и токсины. Lf также может вызывать митохондриальную и каспазо-зависимую регулирующую гибель клеток и апоптоз. Все эти механизмы являются важными мишенями для лечения Lf заболеваний вирусной этиологии.

Насыщенная железом молекула Holo-Lf может содержать до двух ионов железа. Holo-Lf может быть бактерицидной против некоторых патогенов. Лактоферрицины (Lfcins) представляют собой пептиды, полученные из N-конца Lf, которые продуцируются путем протеолиза с пепсином или другими ферментами в условиях кислой среды. Они проявляют мощные антимикробные свойства. Важно отметить, что нет опубликованных исследований о патогенах, устойчивых к Lf и Lfcins. Lf и Lfcins показали синергетический эффект с противомикробными и противовирусными препаратами. Благодаря свойствам Lf, являющимся микробиостатическими, бактерицидными, противовоспалительными и иммуномодулирующими, белок представляет собой отличную естественную альтернативу как самостоятельно, так и в качестве вспомогательного средства в борьбе с бактериями с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам и другими патогенами [19].

Полученные данные об ингибировании интернализации лентивирусных частиц в мембрану и геном клетки пептидом молозива согласуются с результатами исследований Wang et al. [20], в которых доказано, что пептиды способны эффективно блокировать заражение псевдовиром до 50 % путем ингибирования связывания клеточных линий хозяина с белком S1, о чем свидетельствуют результаты вестерн-блоттинга и анализа псевдовиральной люциферазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании исследований можно предположить, что исследуемый пептид относится к мембраноактивным противовирусным пептидам, которые специфически ингибируют слияние мембран вируса и клетки-хозяина. Установлено, что выделенный из молозива коров пептид mpT быстро и непосредственно взаимодействует с вирионами, дестабилизируя вирусную оболочку и стимулируя агрегацию вируса и/или слияние межвирионной оболочки. С учетом ранее проведенных нами исследований, свидетельствующих о том, что пептид mpT не обладает цитотоксичностью, токсичностью, а также новых полученных структурно-молекулярных и противовирусных характеристик пептида можно рекомендовать использовать mpT для разработки, опти-

мизации или создания новых пищевых продуктов противовирусной направленности с широким спектром действия. При этом следует отметить, что существует огромный пробел в знаниях в отношении токсичности, аллергенности, стабильности, биодоступности и эффективности биопептидов в составе продуктов функционального назначения, особенно в экспериментах *in vivo*. Получение таких знаний позволит научно обосновать роль продуктов питания, обогащенных биопептидами в здоровье человека и, соответственно, коммерциализовать такие пищевые продукты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Park, Y.W. & Nam, M.S. (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35 (6), 831–840, <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>.
2. Giacometti, J. & Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry*, 230, 91–98, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.016>.
3. Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A. & Soltani, M. (2017). Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 567–575, <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.014>.
4. Kocak, A., Sanli, T., Anli, E.A. & Hayaloglu, A.A. (2020). Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. *Lwt*, 123 (February), 109127, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109127>.
5. Buttar, H.S., Bagwe, S.M., Bhullar, S.K. & Kaur, G. (2017). Health benefits of bovine colostrum in children and adults. *Academic*. 3–20, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809868-4.000017>.
6. Gruden, Š., Poklar, U. Diverse Mechanisms of Antimicrobial Activities of Lactoferrins, Lactoferricins, and Other Lactoferrin-Derived Peptides. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(20):11264.
7. Sienkiewicz, M., Szymańska, P. & Fichna, J. (2021). Supplementation of bovine colostrum in inflammatory bowel disease: Benefits and contraindications. *Advances in Nutrition*, 12 (2), 533–545.
8. Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K. & Abe, F. (2014). Lactoferrin for prevention of common viral infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20 (11), 666–671, <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.08.003> PMID: 25182867.
9. Silva, E., Rangel, A., Mürmam, L., Bezerra, M.F. & Oliveira, J.P.F.D. (2019). Bovine colostrum: Benefits of its use in human food. *Food Science and Technology*, 39, 355–362, <https://doi.org/10.1590/fst.14619>.
10. Ibrahim, H.R., Isono, H. & Miyata, T. (2018). Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 4(3), 273–280, <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.004>.
11. Kumar, D., Chatli, M.K., Singh, R., Mehta, N. & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare that there is no conflict of interest.*

Статья поступила в редакцию 20.01.2023; одобрена после рецензирования 13.03.2023; принята к публикации 21.03.2023.

The article was received by the editorial board on 20 Jan 2022; approved after editing on 13 Mar 2023; accepted for publication on 21 Mar 2023.

Research, 139, 20–25, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>.

12. Brice, D. & Diamond, G. (2020). Antiviral Activities of Human Host Defense Peptides. *Curr Med Chem.*; 27 (9):1420-1443.

13. Heydari, H, Golmohammadi, R., Mirnejad, R., Tebyanian, H., Fasihi-Ramandi, M. & Moghaddam, M. (2021). Antiviral peptides against Coronaviridae family: A re-view. *Peptides*. 139. 170526.

14. Fu, Y., Jaarsma, A.H. & Kuipers, O.P. (2021). Antiviral activities and applications of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Cell Mol Life Sci.*; 78(8): 3921-3940.

15. Ashaolu, T., Nawaz, A., Walayat, N. & Khalifa, I. (2021). Potential "biopeptidal" therapeutics for severe respiratory syndrome coronaviruses: a review of antiviral peptides, viral mechanisms, and prospective needs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 105(9). 3457-3470.

16. Zannella, C., Chianese, A., Palomba, L., et al. (2022). Broad-Spectrum Antiviral Activity of the Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin L and Its Analogs. *Int J Mol Sci*. 23(4). 2060.

17. Hoffmann, A.R., Guha, S, Wu, E., et al. (2020). Broad-Spectrum Antiviral Entry Inhibition by Interfacially Active Peptides. *J Virol*. 94(23).e01682-20.

18. Vanzolini, T., Bruschi, M., Rinaldi, A.C., Magnani, M, Fraternali, A. (2022). Multitalented Synthetic Antimicrobial Peptides and Their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Mechanisms. *Int J Mol Sci.*; 23(1):545.

19. Zarzosa-Moreno, D., Avalos-Gómez, C., Ramírez- Texcalco, L., et al. (2020). Lactoferrin and Its Derived Peptides: An Alternative for Combating Virulence Mechanisms Developed by Pathogens. *Molecules*. 25(24). 5763.

20. Wang, T., Fang, X., Wen, T., et al. (2021). Synthetic Neutralizing Peptides Inhibit the Host Cell Binding of Spike Protein and Block Infection of SARS-CoV-2. *J Med Chem*. 64(19). 14887-14894.

Информация об авторах

С. Л. Тихонов – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой пищевой инженерии Уральского государственного экономического университета.

И. М. Чернуха – доктор технических наук, профессор, академик РАН, гл. научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова.

Information about the authors

S.L. Tikhonov - Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of the Department of Food Engineering of the Ural State University of Economics.

I.M. Chernukha - Doctor of Technical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Experimental Clinic-Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin of the Federal Scientific Center of Food Systems named after V.M. Gorbatova.