



*Шамова О.В.*

# Пептидомика – медицине: ожидания и реальность

**Актовая речь**

15 декабря 2022 г.

Санкт-Петербург



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Шамова Ольга Валерьевна

**ПЕПТИДОМИКА – МЕДИЦИНЕ: ОЖИДАНИЯ И РЕАЛЬНОСТЬ**

Актовая речь на заседании Ученого совета

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

15 декабря 2022 года

Санкт-Петербург

2022



## *Посвящается моему Учителю – Владимиру Николаевичу Кокрякову*

*«Наука требует от человека всей его жизни. И если бы у вас было бы две жизни, то и их бы не хватило...»* *И. П. Павлов*

Дорогие коллеги!

Я очень рада возможности поделиться с Вами результатами наших многолетних исследований в области антимикробных пептидов врожденного иммунитета, а также сказать теплые слова о моем Учителе, памяти которого я и посвящаю данное выступление - **Владимире Николаевиче Кокрякове**. Изучение антимикробных пептидов стало делом всей его жизни, и для меня он открыл чудесный мир этих молекул.



### **Открытие новых пептидов**

Слово «Пептидомика», конечно, звучит слишком громко. Но это не просто дань модным тенденциям - связывать всё с «омиксными» технологиями. Пептидомика – совокупность знаний о пептидном составе живых объектов – от вирусных частиц, бактерий до клеток, тканей, органов высших позвоночных, включая человека. Пептидомика относительно недавно стала рассматриваться, как самостоятельная область знания, а не раздел Протеомики. Однако большой объем накопленных данных о многообразии и высокой значимости биологически активных пептидов для жизнедеятельности организма определил повышенное внимание к данной сфере. Если белки можно образно сравнить с «ломовой лошадкой», везущей груз важнейших биохимических процессов в живой клетке, выполняющей структурную, каталитическую, защитную и множество других функций, то пептиды – это волшебный «Конек-Горбунок», который, несмотря на маленький рост, мог управлять событиями и находить выход из различных сложных ситуаций. Пептиды, благодаря небольшим размерам, чрезвычайно мобильны, что позволяет им играть роль биорегуляторов и инициировать или координировать разнообразные жизненно важные процессы. А антимикробные пептиды (АМП) иммунной системы – достойные представители многофункциональных соединений. Это не обломки больших белков, полученные в результате действия случайных протеаз, а зрелые молекулы,

образующиеся из определенных предшественников, и формирующие активный пептид, в основном, только в ответ на определенный стимул, а также имеющие известные молекулярные мишени.

Мне хотелось бы на примере наших исследований кратко описать весь долгий путь, начинавшийся от собственно исследований в области пептидомиики - анализа белкового состава экстрактов клеток врожденного иммунитета самых разных животных, выделения и характеристики новых антимикробных пептидов, - до следующих этапов, связанных с попытками создать на основе этих пептидов «продукт», востребованный медициной – прототип лекарственного препарата. Хочется верить, что наши попытки увенчаются успехом, и в недалеком будущем удастся сделать существенные шаги на пути продвижения в практическую медицину новых антимикробных, противоопухолевых, нейропротекторных пептидных препаратов.

Исследования защитных факторов клеток врожденного иммунитета проводились в ИЭМе с давних пор. Не буду повторять прекрасную актовую речь Владимира Николаевича Кокрякова, который очень полно охарактеризовал основные вехи на пути развития пептидных исследований в ИЭМе и в мире, начиная с основополагающих работ Ильи Ильича Мечникова, но все же постараюсь рассказать о некоторых прошлых и нынешних важнейших результатах по изучению пептидов в Институте.

Итак, когда я пришла работать в ИЭМ в 1987 году после окончания обучения в СПбГУ, моим руководителем стал Владимир Николаевич, который ознакомил меня с работами отдела патологической анатомии, возглавляемого Валерием Евгеньевичем Пигаревским. Одним из важных направлений отдела было изучение "лизосомальных катионных белков" нейтрофилов человека и животных. Существование этих низкомолекулярных катионных белков, обладающих антимикробным действием впервые было показано американскими исследователями Зейя и Спитцнагелем в шестидесятых годах (Zeya, Spitznagel, 1963), обнаружившими их в нейтрофилах кролика и морской свинки. В то время, как западные ученые обратили пристальное внимание на эти соединения только через 20 лет, расшифровав их структуру и дав название «дефенсины», в нашей стране пионерские исследования «низкомолекулярных лизосомальных белков» нейтрофилов активно развернулись уже в 70-х годах в НИИ Экспериментальной медицины и на кафедре биохимии Ленинградского университета. Неоценимый вклад в развитие работ по изучению гранулоцитарных катионных белков, обладающих антимикробной активностью, внес профессор В.Е.

Пигаревский. Им сделано много замечательных открытий, в том числе сформулировано представление о секреторной активности нейтрофильных гранулоцитов и раскрыты ультраструктурные механизмы этого процесса, охарактеризовано явление резорбтивной клеточной резистентности как особой формы антимикробной защиты организма, разработан и внедрен в клиническую практику лизосомально-катионный тест для прогнозирования течения и экспресс-оценки проводимой терапии заболеваний бронхолегочной системы, гнойных хирургических заболеваний, ожоговой болезни, пародонтоза. Важно, что с течением времени лизосомально-катионный тест не утратил своего значения и продолжает активно использоваться в клинической практике.

Начав научную работу в отделе, я приобщилась к исследованиям, посвященным молекулярным факторам нейтрофильных гранулоцитов, и включилась в работу по выделению новых, ранее неизвестных «низкомолекулярных катионных белков» нейтрофилов ряда парнокопытных, птиц, беспозвоночных, под руководством Владимира Николаевича Кокрякова, который и научил меня разнообразным, существующим на тот момент, методам и подходам для анализа белкового спектра в лейкоцитарных экстрактах, полученных из крови различных животных, методам выделения и очистки этих веществ. Не могу не упомянуть известного ученого, развившего учение о биологически активных пептидах. Это академик РАМН - Игорь Петрович Ашмарин. Он был, в свою очередь, руководителем кандидатской диссертации Владимира Николаевича и объединил усилия ученых ИЭМа и сотрудников кафедры биохимии Ленинградского государственного университета, где Игорь Петрович был заведующим с 1964 по 1976 год, по изучению белковых факторов врожденного иммунитета. И.П. Ашмарин впоследствии разработал концепцию функционального континуума регуляторных пептидов и математическую модель действия пептидных комплексов (1986-2002). Уже в более поздний период научной деятельности, работая в Москве, совместно с коллективом авторов, И.П. Ашмарин создал пептидный препарат Семакс, вошедший в практику лечения инсультов и других видов патологии (1992-1997), а также установил существование нового семейства пептидных регуляторов - глипролинов. Таким образом, Владимир Николаевич Кокряков принял эстафету исследования защитных факторов нейтрофилов и посвятил всю жизнь исследованию антимикробных пептидов – в первую очередь, поиску и выделению новых АМП из клеток врожденного иммунитета животных, относящихся к различным таксономическим группам. Конечно, тогда

вокруг Владимира Николаевича был коллектив единомышленников, многие из которых и сейчас продолжают эти исследования – Галина Матвеевна Алешина, Наталья Сергеевна Новикова и другие.

В ходе исследований были открыты новые АМП в клетках врожденного иммунитета животных разных таксономических групп – протегрины, профенины свиньи, ареницины морской полихеты, аципенсины осетровых рыб, бактенецины коз и овец, бета-дефенсины черепах и другие пептиды. У нас тогда не было высокотехнологичного оборудования, новые пептиды мы выявляли, используя, в том числе и метод электрофореза в стеклянных трубках. Сейчас уже мало кто помнит эти установки, но когда-то такие камеры с успехом использовались.

Важным событием был приезд в наш институт с лекцией профессора Роберта Лерера – лидера в исследовании антимикробных факторов нейтрофилов, руководившего работами, приведшими к открытию дефенсинов. Профессор Р. Лерер пришел в Отдел и ознакомился с результатами наших исследований, после чего пригласил сотрудников отдела поработать в его лаборатории в США в Калифорнийском университете Лос-Анжелеса. В результате этого сотрудничества были открыты пептиды протегрины, профенины домашней свиньи, галинацины кур, бактенецины коз и овец. Протегрины впоследствии стали одними из наиболее востребованных объектов исследования в различных лабораториях мира.

Многие сотрудники отдела получили возможность съездить на стажировку в Калифорнийский университет Лос-Анжелеса, где были по тому времени самые передовые методы пептидной химии. Были заключены договоры о сотрудничестве, получены гранты, у нас в отделе до сих пор функционируют приборы, купленные на средства этих грантов.

В 1988 году мы перешли в отдел Елены Андреевны Корневой, которую я могу назвать своим вторым Учителем. Благодаря работе под ее руководством мы смогли пептидные исследования вывести на принципиально новый уровень. Пептиды стали рассматриваться как полифункциональные соединения, в частности, оказалось, что АМП могут участвовать и в нейроиммунном взаимодействии.

Еще в конце 1980-х годов появились сведения, что пептиды дефенсины обладают кортикостатической активностью, то есть подавляют стимулированную адренкортикотропным гормоном продукцию глюкокортикоидов клетками надпочечников. Это было установлено на модели *in vitro* (Zhu et al., 1987). Мы показали это в экспериментах *in vivo*, установив, что пептиды дефенсины и протегрин 3 снижают индуцирован-

# Открыты новые АМП



*Sus scrofa*

**Протегрины свиньи**  
 PG-1 RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH2  
 PG-2 RGGRLCYCRRRFCICV-NH2  
 PG-3 RGGGLCYCRRRFCVCVGR-NH2

**θ-дефенсин павиана**  
 RCVCTRGFRCRCVCRRGVC



*Papio hamadryas*



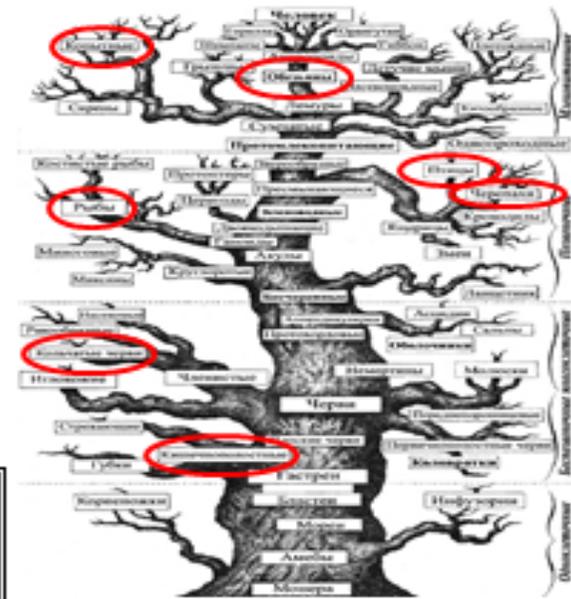
*Capra hircus*

**Бактенецины козы**  
 ChBac5 RFRPPIRRPPIRPPFNPPFRPPV  
 RPPFRPPFRPPFRPPIGFFP-NH2  
 ChBac3.4 RFRLPFRPPIRIHPPP  
 FYPPFRRL-NH2  
 mini-ChBacNo  
 RRLRPRRPLRPRRPRRPRR



*Gallus gallus*

**Галлинацины курицы**  
 Gal 1 GRKSDCFRKSGFCAFLKCP  
 SLTLISGKCSRFLYLCCKRIWG




*Emys orbicularis*

**β-дефенсины болотной черепахи**  
 TBD1 YDL SKNCRLRGGICYIGKC  
 PRRFFRSGSCSRGNVCLFRG



*Acipenser gueldenstadti*

**Аципенсины осетра**  
 AC1 Ac\$GRGKTGGKARAKAKTR\$  
 \$RAGLQFPVGRVHRLLR  
 AC2 Ac\$GRGKTGGKARAKAKTR\$\$RA GL  
 QFPVGRVHRLLRKGNYAQRVGAGAPV  
 AC3 Ac\$GRGKTGGKARAKAKTR\$\$RAGL  
 QFPVGRVHRLLRKGNYAQRVGAGAPVY  
 AC6 ILELAGNAARDNKKTRIPRHLQL

*Arenicola marina*



**Ареницины пескожила**  
 AR1 RWCYAYVRVGRVLRVYRRCW  
 AR2 RWCYAYVIRGVLVRYRRCW



*Aurelia aurita*

**аурелин медузы**  
 AACSDRAHGICE\$FK\$FCK  
 DSGRNGVKLRANCKKTCGLC

ный АКТГ или стрессом подъем уровня кортикостерона в крови экспериментальных животных. Кроме того, описано в литературе и показано в наших работах, что дефенсины модулируют некоторые эффекты  $\alpha$ -меланоцит-стимулирующего гормона в отношении клеток иммунной системы. Конечно, можно подумать, что это случайность, «пробирочный феномен».

Но это не так. В этом мы можем убедиться, выйдя на улицу и посмотрев на прохожих, выгуливающих разношерстных собачек: как оказалось, цвет шести собак зависит именно от того..., какая изоформа пептидов дефенсинов у них имеется. Исследователи-собаководы на протяжении нескольких лет пытались найти ген, ответственный за приобретение той или иной окраски шерсти собак. Как ни удивительно, оказалось, что это ген, кодирующий один из бета-дефенсинов -  $\beta$ -дефенсин 3 собаки (CBD103), сходный по структуре с  $\beta$ -дефенсином 3 человека (hBD3). Как было показано группой ученых (Candille S. и соавт., 2007), этот пептид связывается с рецептором MCR-1 на меланоцитах домашних собак (или ряда других представителей семейства псовых). Мутация в гене, кодирующем  $\beta$ -дефенсин CBD103, обуславливает появление белкового продукта –  $\beta$ -дефенсина, первичная структура которого отличается отсутствием N-концевого остатка глицина. Этот пептид имеет повышенное сродство к рецептору MCR-1 на меланоцитах, и связывание его с рецептором, препятствующее взаимодействию с этим рецептором известного лиганда – белка агути, приводит к индукции синтеза эумеланина, что обуславливает темную окраску шерсти у животных, в гене которых имеется данная мутация (Candille et al., 2007). Данное наблюдение свидетельствует в пользу представления об АМП, как полифункциональных молекулах.

Нами были получены доказательства того, что антимикробные пептиды альфа-дефенсины модулируют некоторые эффекты  $\alpha$ -меланоцит-стимулирующего гормона на модели асептического воспаления у мышей, а также являются стресс-протективными молекулами. Сейчас это направление исследований развивает д.б.н. Г.М. Алешина.

Кроме упомянутой кортикостатической активности АМП проявляют широкий спектр биологических эффектов, которые реализуются при развитии различных патофизиологических процессов, когда пептиды выделяются клетками в ответ на тот или иной стимул. В литературе есть данные, что АМП обладают липополисахарид-связывающей активностью, ряд пептидов проявляет цитотоксическую активность в отношении опухолевых и нормальных клеток человека *in vitro*, некоторые пептиды

демонстрируют ранозаживляющие эффекты; АМП стимулируют хемотаксис макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток; дегрануляцию тучных клеток, увеличивают проницаемость сосудов и стимулируют их рост; влияют на функциональную активность и метаболизм тромбоцитов связывают бактериальный липополисахарид; опосредованно модулируют процессинг предшественника IL-1.

Среди АМП имеются совершенно различные по структуре пептиды, поэтому неудивительно, что и по своим биологическим свойствам они существенно отличаются. В нейтрофилах одного вида животных содержится набор защитных молекул – белков и пептидов, участвующих в реализации защитных функций, дополняя или регулируя активность друг друга.

Характер действия АМП на эукариотические клетки во многом зависит от концентраций этих веществ в среде. Антимикробные эффекты большинства АМП реализуются при действии пептидов в диапазоне концентраций 1-10 мкМ. В концентрациях, в несколько раз больших, чем необходимые для проявления антимикробных эффектов, многие АМП оказывают токсическое действие в отношении собственных клеток организма; как нормальных, так и трансформированных. В норме концентрация АМП в плазме крови невысока и составляет 10-40 нМ, но при различных формах патологии (инфекционном процессе, дистрессе и др.) происходит высвобождение во внеклеточное пространство содержимого лизосомоподобных гранул нейтрофилов – клеток, являющихся доминирующей фракцией лейкоцитов крови, а также одними из основных источников АМП. В результате концентрация этих веществ в крови может повышаться на один-два порядка. Часть АМП связывается с белками плазмы крови, теряя свою биологическую активность.

Иммуномодулирующие свойства пептидов давно привлекали внимание ученых. Разгорались даже научные споры, является ли антимикробная активность пептидов их основным свойством, не играют ли они роль, в первую очередь, иммунорегуляторных молекул. В ходе этих научных споров возникло и второе название антимикробных пептидов – *host defense peptides* – защитные пептиды организма. Приверженцы концепции пептидных иммуномодуляторов разработали новое направление – исследование IDR (Innate Defense Regulators) пептидов – молекул, не обладающих выраженной антимикробной активностью, но эффективно защищающих от инфекции за счет иммуномодулирующих свойств – стимулируя выброс определенных цитокинов и регулируя течение воспалительной реакции. Показано, что эти пептиды, в частности

аналоги додекапептида (IDR-1002, IDR-НН2, IDR-1018), снижают смертность животных от летальных инфекций (Niyonsaba et al., 2013).

Таким образом, АМП могут рассматриваться, как многофункциональные защитные молекулы. Однако, в данном докладе мне хотелось бы сделать акцент на антибиотических свойствах пептидов.

Под руководством Владимира Николаевича были открыты новые антимикробные пептиды. Мы приняли эстафету, и перешли к другому этапу – исследованию свойств не только природных, но и синтетических - сконструированных пептидов, а также поиску путей создания на их основе новых лекарственных средств.

### **Пептиды эффективны в отношении мультирезистентных бактерий**

В настоящее время все более остро встает проблема поиска новых, эффективных средств борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями. Если в конце 20-го – начале 21-го века смертность от инфекционных болезней была относительно невысока, то в последние годы, к сожалению, картина ухудшается. Неблагоприятная экологическая обстановка, неправильный образ жизни, постоянные стрессовые ситуации, последствия вирусных инфекций (в особенности, COVID-19) приводят к снижению иммунной защиты. По прогнозам, к 2050 году смертность от инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями, достигнет 10 млн человек в год. Особенно остро стоит проблема борьбы с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП). К числу наиболее опасных возбудителей таких инфекций, отнесенных ВОЗ к 1 категории приоритетности, принадлежат мультирезистентные грамотрицательные бактерии рода *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства *Enterobacteriaceae* (включая *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* и *Proteus*), устойчивые к карбопенемам и другим антибиотикам. Сейчас используют и термин ESCAPE для обозначения группы грамотрицательных и грамположительных бактерий (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*) также вызывающих жизнеугрожающие инфекции, с трудом поддающиеся лечению.

Особую проблему составляют бактерии, формирующие биопленки, что многократно повышает их устойчивость к химиопрепаратам. Поиск средств борьбы с такими бактериями является наиболее насущной задачей экспериментальной и практической медицины.

В свете перечисленных проблем, связанных с растущей антибиотикорезистентностью, все большее внимание ученых обращается к

антимикробным пептидам животного происхождения. Эффективность пептидов обусловлена особенностями механизма их антимикробного действия. Оно реализуется быстро, так как для большинства АМП основной мишенью являются бактериальные мембраны. Наличие положительного заряда позволяет пептидам электростатически связываться с анионными компонентами мембран микробных клеток (анионными фосфолипидами, липополисахаридами, тейхоевыми кислотами), а благодаря гидрофобным свойствам – встраиваться в липидные бислои мембран. Результатом встраивания АМП в липидную мембрану обычно бывает нарушение ее структурной целостности, приводящее к быстрой гибели бактериальных клеток, хотя характер наблюдаемых эффектов взаимодействия пептидов с мембранами различен и зависит от структуры АМП. Быстрота антимикробного действия, во многом определяет и затрудненность формирования резистентности микроорганизмов. Одним из типичных представителей пептидов с выраженной мембранолитической активностью является наш любимый объект - протегрин 1. Этот пептид характеризуется широким спектром антимикробной активности: минимальные ингибирующие концентрации пептида для большинства исследованных штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий, пептид обладает и антимикотическим действием.

Однако некоторые АМП инактивируют микроорганизмы без существенного повреждения их цитоплазматической мембраны, а преимущественно действуют путем нарушения различных процессов жизнедеятельности бактерий – синтеза нуклеиновых кислот, белка, процессов фолдинга белка, образования клеточной стенки и других ключевых процессов. В большинстве случаев каждый АМП имеет не одну, а нескольких мишеней антимикробного действия: повреждает мембраны бактериальных клеток в той или иной степени, а также нарушает и внутриклеточные процессы. Множественность мишеней обуславливает, в свою очередь, и затрудненное формирование к пептидам бактериальной резистентности. Для многих АМП показана способность предотвращать формирование биопленок бактериями, а также разрушать уже сформированные биопленки.

Пептидные антибиотики, как известно, применяются в медицине уже много лет. Имеющий мировую известность грамицидин С, полученный впервые российскими учеными, спас сотни жизней во время Великой отечественной войны. Другие антибиотики, созданные на основе пептидов

(подавляющее большинство - микробного происхождения), применяются в медицине и ветеринарии – полимиксины В и Е, кубикин и другие препараты. Несмотря на эффективность этих соединений, существует ряд проблем, связанных с их использованием – относительно высокая токсичность, обуславливающая частое развитие побочных эффектов, дороговизна некоторых препаратов (например, кубикина). Бактерии или грибы, продуцирующие данные соединения, используют их исключительно для конкурентной борьбы с соседствующими с ними микроорганизмами. Поэтому пептиды животного происхождения имеют существенное преимущество – наличие и других защитных свойств, например, свойство ускорять заживление ран, иммуномодулирующие свойства и многие другие виды активности, которые, вероятно, пептиды приобрели в ходе долгого пути эволюции защитных систем различных представителей царства животных.

Однако на пути внедрения пептидов в медицину имеются и существенные проблемы. Хотя, в целом, структурные различия эукариотических и бактериальных мембран обеспечивают преимущественное действие АМП в отношении клеток микроорганизмов, во многих случаях высокоактивные мембранолитические пептиды могут демонстрировать сравнительно высокую токсичность и против нормальных клеток макроорганизма. Кроме того, многие АМП теряют активность в биологических жидкостях, подвергаясь расщеплению протеазами. Повышение стабильности и снижение токсичности являются приоритетными направлениями при создании химических модификаций природных АМП с ориентацией на возможное практическое применение.

Для преодоления существующих проблем имеются разные подходы. В частности, можно создать линейку новых структур на основе знания о преимуществах и недостатках имеющегося АМП, исследовать их биологические эффекты, определить ключевые параметры (например, терапевтический индекс или индекс селективности) и отобрать пептиды с оптимальными свойствами – высокой антимикробной активностью, безопасные для клеток человека. Другой подход – использование пептидов в комбинации с другими антибактериальными соединениями, при совместном действии с которыми наблюдается синергизм.

Нам очень повезло – в 2015 г. по проекту, выполнявшемуся в рамках Программы «Протеом человека» (руководитель программы профессор В.Б. Васильев) в числе прочего оборудования в ИЭМ был приобретен пептидный синтезатор, который Вадим Борисович любезно передал нашему отделу. К тому времени у нас был сформирован широкий круг

задач, связанный с исследованием различных структурных модификаций АМП, и получение синтезатора позволило перейти от планирования к реализации этих задач, тогда в отделе была создана в 2015 году новая **лаборатория дизайна и синтеза биологически активных пептидов**. Наличие возможности конструирования новых структур позволило создать и исследовать целый ряд аналогов пептида ареницина, протегрина, бактенецинов. Есть много подходов к разработке новых пептидов – это и масштабный скрининг, когда анализируется значимость каждой аминокислоты, и разнообразные «точечные замены». Нами, в основном использовался рациональный дизайн на основе уже имеющихся данных о молекулярных механизмах действия, известных мишенях, комбинировании структурных паттернов и пр. Помимо антимикробных пептидов в лаборатории разрабатывались и соединения, обладающие противоопухолевым или нейропротекторным действием.

Пептидные исследования получили новый толчок, когда в 2020 году на базе консорциума ИЭМа с НМИЦ им. В.А. Алмазова был создан Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины». Темой одного из проектов в рамках существования данного центра стала *«Разработка новых антимикробных агентов для борьбы с внутрибольничными инфекциями на основе природных антимикробных пептидов и бактериофагов»*.



Цель проекта - разработка прототипов новых антибиотиков для терапии внутрибольничных инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями, на основе синтетических аналогов природных антимикробных пептидов с различным спектром антибактериальной активности, а также бактериофагов; оценка их эффективности и безопасности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В задачи работы, связанные с созданием пептидного препарата, вошли:

- ✓ Разработка структурных аналогов природных АМП, имеющих разный спектр биологической активности, их химический синтез;
- ✓ Оценка антимикробной активности пептидов в отношении антибиотикорезистентных клинических изолятов грамотрицательных и грамположительных бактерий (полученных из инфицированных ран, ротовой полости, мочеполового тракта) в отношении свободно плавающих (планктонных) бактерий и бактериальных биопленок - на моделях *in vitro*;

- ✓ Оценка безопасности наиболее активных пептидов для клеток человека в культуре, выбор пептидов, безопасных для исследуемых клеток; Изучение совместного действия пептидов с применяемыми в клинике антибиотиками и антисептиками, выявление синергических эффектов при использовании пептидов в комбинации с антимикробными соединениями различной природы в отношении антибиотикоустойчивых штаммов бактерий; выбор комбинаций, соединений, применение которых оптимально при инфицировании определенными видами бактерий.
- ✓ Оценка эффективности и безопасности полученных пептидов *in vivo* (на модели инфицированной раны у мышей).

Для решения этих задач в составе НЦМУ была организована **лаборатория альтернативных антимикробных биопрепаратов**.

В процессе выполнения проекта выяснилось, что от нас ждут совсем не гипотетический пептид-прототип лекарственного препарата, а уже готовый «продукт», который в кратчайшие сроки мы внедрим в практическую медицину. Задача представляется трудновыполнимой, однако «дорогу осилит идущий» - мы проводим исследования, ищем спонсоров и надеемся на лучшее. Далее в ходе доклада я остановлюсь на некоторых результатах, полученных в ходе выполнения этого проекта, так как направление работ наиболее созвучно тематике сегодняшнего выступления.

Объектами исследования стали разработанные нами новые структурные аналоги открытых в отделе пептидов (протегринов, бакетнецинов, ареницинов) и других АМП. К сожалению, открытый нами в начале 90-х годов пептид протегрин 1, обладающий высочайшей антимикробной активностью, стал излюбленным объектом исследования многочисленных лабораторий по всему миру, что несколько осложнило наши задачи в плане изобретения новых модификаций пептида. Поэтому, кроме пептидов, открытых в ИЭМе, мы обратили внимание и на другие объекты – АМП, описанные в литературе, но малоизученные. Был проведен поиск таких малоизученных пептидов, обладающих высокой активностью, но низкой токсичностью для клеток макроорганизма, мы остановились на таких АМП, как бета-шпилечный пептид шучин, пролин-богатые пептиды (ПБП), в том числе ПБП ракообразных (астацидин 2 (*Pacifastacus leniusculus*) и астацидин PcAst-1b/c (*Procambarus clarkii*)), ПБП млекопитающих — SP-B слюны домашней свиньи (*Sus scrofa*), а также триптофан-богатый пептид — кателицидин буйвола buCATHL4D (*Bubalus bubalis*), пролин-богатые пептиды дельфинов Tur1, кателицидин

водяного буйвола buCATHL4D и др. Ниже приведены структуры некоторых АМП, исследуемых в рамках проекта.

*Бета-шипилочные пептиды:*

Шучин 4 — Sh4 KAYSTPRCKGLFRALMCWL

Ареницин 1 (AR1): RWCYVYAYVRVRGVLVRYRRCW-NH<sub>2</sub>

Аналог ареницина 1 (AR1-A) — RWAVYAYVRVRGVLVRYRRAW-NH<sub>2</sub>

Протегрин 1 — (PG1) — RGGRLCYCRRRFCVCGR-NH<sub>2</sub>

*Пролин-богатые пептиды ракообразных:*

Астацидин 2 (AC2) — RPRPNYRPRPIYRP

Астацидин PcAst-1b/c (PcAst-1b/c) — SNVYRPPPYRPPVYRPLRRPGYRP

*Пролин-богатые пептиды млекопитающих:*

Бактенецин 3.4 — Bac3.4 — RFRLPFRPPPIRHPFFYPPFRRFL-NH<sub>2</sub>,

Модификации бактенецина 3.4:

Bac3.4-1 — RFRRFRLPFRRIHPFFVRIHPFFYRRFL-NH<sub>2</sub>,

Bac3.4-2 — RFRRFRLPFRPPPIRHP-NH<sub>2</sub>,

SP-B — пролин-богатый пептид слюны домашней свиньи  
APPGARPPPGPPPPGPPPPGP

Триптофан-богатый пептид — кателицидин буйвола buCATHL4D —  
RIRFPWPWRPWWPRFRG

Правда, впоследствии оказалось, что данные литературы не всегда воспроизводятся в наших условиях – некоторые пептиды имели крайне низкую активность.

Еще одним важным направлением стал поиск новых – не известных ранее пептидов – уже не путем выделения и очистки их из клеток животных, а с применением биоинформатических методов. Такую работу провел недавно пришедший в наш коллектив сотрудник - Игорь Елисеев. На основе анализа данных литературы о структурах предшественников различных пептидов, а также имеющейся в свободном доступе новой информации о геномах и транскриптомах ряда видов животных, он открыл два, ранее не известных, АМП. Им были проанализированы новые биоинформатические методы идентификации антимикробных пептидов, основанные на применении машинного обучения. Известно, что некоторые классы АМП обладают достаточно крупным белком-предшественником — про-пептидом, и его можно использовать при поиске новых пептидов как «маркер». В рамках представленного проекта с использованием информации, доступной в базе Uniprot, исследование гомологии пропептидов различных животных (позвоночных и беспозвоночных) было применено для идентификации новых АМП, активных в отношении антибиотикорезистентных патогенов. Из найденных гомологов пептида морской полихеты нами был отобран белок из недавно аннотированного генома безногой амфибии *Microcaecilia unicolor* (одноцветная

микроцецилия или крошечная кайенская червяга), имеющий небольшой С-концевой фрагмент, по структуре сходный с некоторыми бета-шпильчатыми пептидами. Более детальный поиск показал, что в геноме родственного организма *Rhinatrema bivittatum* также есть гомологичный белок со сходным доменом предшественника и гомологичным С-концевым фрагментом.

Примечательно, что оба животных являются позвоночными, безногими амфибиями, но при этом внешне похожи на кольчатых червей. Последовательности зрелых пептидов были установлены исходя из гомологии с другими АМП, имеющими сходные структуры предшественников. Предполагается, что процессинг пропептида осуществляется фуриновой протеазой. В идентифицированных белках на С-конце также присутствует аналогичный сайт (RR), что позволяет предположить последовательность зрелых пептидов длиной 20 а.к. Исходя из симметричного расположения 4-х остатков цистеина, можно предположить, что зрелый пептид имеет структуру бета-шпильки, как и большинство других сходных АМП. Для более детального структурного анализа Игорем Елисеевым было проведено моделирование при помощи алгоритма AlphaFold v.2 (Jumper et al., 2021). Для обоих пептидов с высокой вероятностью была предсказана структура антипараллельной бета-шпильки с правой закрученностью. Пептид, рассчитанный на основе данных по геному червяги (цецилии) *Microcaecilia unicolor*, был назван нами мицецилин, а пептид *Rhinatrema bivittatum* — рицецилин. Для дальнейших исследований пептиды мицецилин (МС) и рицецилин (РС) были синтезированы посредством твердофазного синтеза, очищены с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, и исследована их биологическая активность в отношении антибиотикорезистентных бактерий.



*Microcaecilia unicolor*

Анализ антимикробной активности новых пептидов безногих амфибий, как и других пептидов, перечисленных выше, проводили в отношении клинических изолятов бактерий - мультиантибиотикорезистентных госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из смывов при проведении бронхоальвеолярного лаважа пациентов, госпитализированных для лечения COVID-19; а также против бактерий, полученных от

пациентов с инфицированными ранами, в том числе карбопенем-устойчивых штаммов (Табл. 1). Показано, что все исследованные пептиды проявляют высокую антимикробную активность в отношении перечисленных бактерий (минимальные ингибирующие концентрации в большинстве случаев находились в диапазоне 0.125 - 2 мкМ или 0.3-2.5 мкг/мл).

Бета-спилечные пептиды протегрин и ареницин, а также пролин-богатый пептид бактенецин проявили наиболее выраженную антимикробную активность. Линейный аналог ареницина практически не отличался по показателям активности от пептида с нативной структурой.

Пептиды SP-B, астацидины оказались неактивны в отношении исследуемых мультирезистентных бактерий. Возможно, описанная в литературе высокая антимикробная активность данных пептидов была охарактеризована в других экспериментальных условиях, а использованные авторами микроорганизмы были более чувствительны к данным соединениям. Грамотрицательные бактерии родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, устойчивые к карбопенемам и другим антибиотикам, как уже упоминалось, отнесены Всемирной организацией здравоохранения к 1-ой категории приоритетности, поэтому результаты, показывающие эффективность ряда исследуемых АМП в отношении этих бактерий, вселяли надежду, что мы на правильном пути.

Известно, что в последние годы существенно выросла значимость в качестве возбудителей нозокомиальных инфекций слабовирулентных микроорганизмов, обладающих природной резистентностью ко многим антимикробным препаратам. К таким микроорганизмам относится и *Stenotrophomonas maltophilia*, которая в настоящее время стала играть серьезную роль в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, поселяясь на поверхности различных изделий медицинского назначения и становясь причиной развития инфекционного процесса у пациентов стационаров. Большинство наших пептидов оказались эффективными в отношении данной бактерии, что указывает на возможность применять пептиды для покрытия катетеров, стентов, комплекующих ИВЛ и других изделий медицинского назначения.

Установлено, что оба новых пептида амфибий – РС и МС проявляют высокую антимикробную активность в микромолярных концентрациях по отношению ко всем протестированным антибиотикорезистентным бактериям, что подтверждает целесообразность выбранного подхода для получения новых структур АМП, перспективных для практического применения.

**Таблица 1** — Антимикробная активность АМП против клинических изолятов антибиотикоустойчивых бактерий

Бактерии	Минимальная ингибирующая концентрация, мкМ <sup>а</sup>												
	buCAT HL4D	AR1	AR1a	Вас3.4	Вас3.4-1	Вас3.4-2	Sh4	АС	PcAst	SP-B	RC	MC	PG-1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5156*	4	2	2	2	8	8	64	>64	>64	>64	4	4	0,13
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5159*	4	1	2	2	8	32	2	>64	>64	>64	2	1	0,25
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5155*	1	1	1	0,25	0,5	0,5	2	64	>64	>64	4	1	0,13
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5159*	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	32	>64	>64	>64	2	1	0,13
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5174 <sup>#</sup>	0,5	1	1	0,25	0,25	0,5	2	64	64	>64	2	1	0,06
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1321 <sup>#+</sup>	2	4	8	4	8	32	64	>128	>128	>128	4	8	0,25
<i>Acinetobacter baumannii</i> 16.63 <sup>#</sup>	0,25	8	8	4	8	32	32	>128	32	>128	2	1	0,06
<i>Acinetobacter baumannii</i> 769.2 <sup>#</sup>	2	2	2	1	2	8	16	>128	>128	>128	4	1	0,5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 414 <sup>#+</sup>	2	8	8	4	8	32	64	>128	>128	>128	8	8	0,13
<b>ГМИК<sup>б</sup></b>	<b>1,26</b>	<b>2,16</b>	<b>2,52</b>	<b>1,17</b>	<b>2,33</b>	<b>5,88</b>	<b>14,81</b>	<b>&gt;87,09</b>	<b>&gt;74,66</b>	<b>&gt;87,09</b>	<b>3,17</b>	<b>1,85</b>	<b>0,15</b>

<sup>а</sup> Значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) приведены как медианы по результатам 3–6 независимых экспериментов.

<sup>б</sup> ГМИК — геометрическое среднее МИК.

\* - бактерии, выделенных из смывов при проведении бронхоальвеолярного лаважа пациентов, госпитализированных для лечения COVID-19;

# - бактерии, полученные от пациентов с инфицированными ранами, в том числе карбопенем-устойчивых штаммов (+)

Пептиды: AR1 - ареницин 1, AR1-A – структурная модификация AP1; Вас3.4 - бактенецин 3.4; Вас3.4-1 = RFR-ChВас3.4(1-14) и Вас3.4-2 = RFR-ChВас3.4-1 – структурные модификации Вас3.4; PcAst-1 – астацидин 1, АС-2 – астацидин 2, MC (мицецилин) – пептид амфибии *Microcaecilia unicolor*; RC (рицецилин) – пептид амфибии *Rhinatrema bivittatum*; PG1 – протегрин 1

Таким образом, показанная активность исследуемых АМП — протегрина, бактенецина, ареницина в отношении перечисленных мультирезистентных бактерий позволяет рассматривать эти соединения, как перспективные кандидаты на роль новых антимикробных средств.

### Пептиды могут проявлять токсичность в отношении клеток человека – пути решения проблемы

Для решения основной задачи данного этапа — отбора наиболее перспективных пептидов с высокой антимикробной активностью, но безопасных для клеток человека, проводили оценку цитотоксической активности исследуемых АМП в отношении клеток человека *in vitro*.

Наиболее простым методом определения токсичности препаратов можно считать характеристику их литического действия в отношении эритроцитов, характеризующую повреждающий эффект этих соединений на мембраны клеток макроорганизма. Проведена оценка гемолитической активности исследуемых пептидов с использованием метода, основанного на количественном определении выходящего из разрушенных эритроцитов в раствор гемоглобина с использованием спектрофотометрии (Рис. 1).

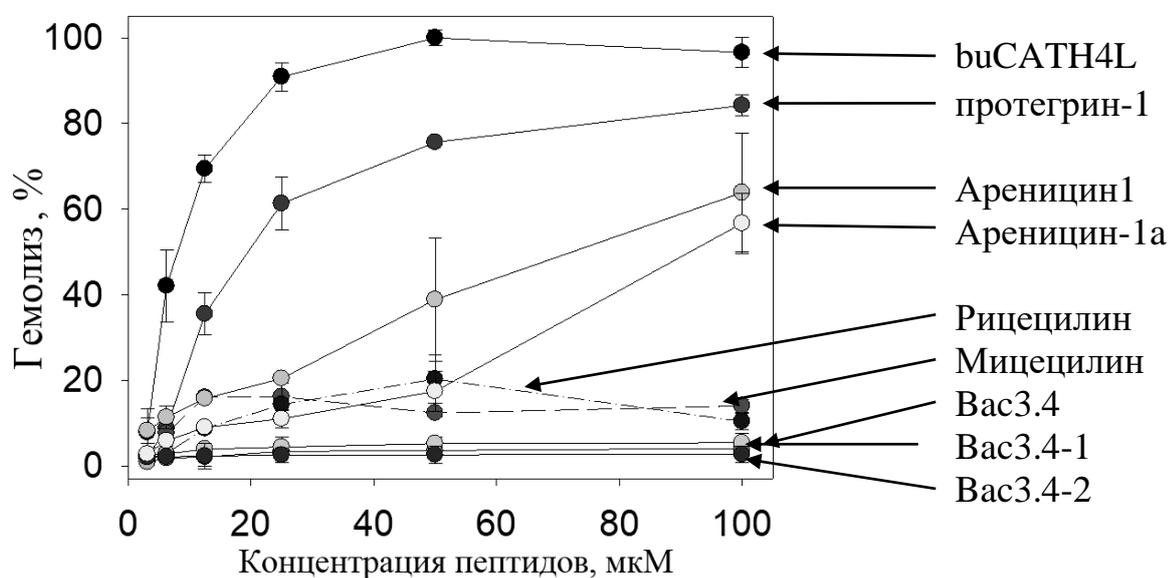


Рисунок 1. Анализ гемолитической активности АМП в отношении эритроцитов человека.

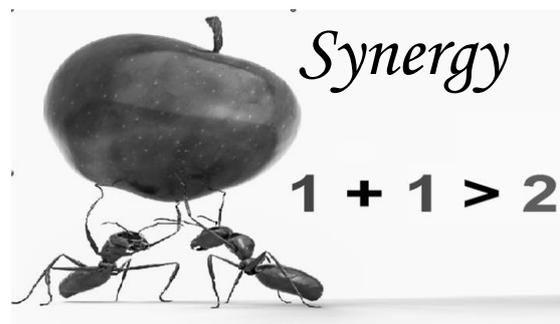
Наиболее активный пептид — мембранолитический протегрин 1 продемонстрировал высокую токсичность для клеток человека, как и кателицидин буйвола БуСАТЛ4. В экспериментах с культивируемыми клетками человека также были получены данные, позволяющие сравнить разные пептиды, рассчитать индексы селективности.

Важным параметром для оценки возможности разработки терапевтического средства на основе того или иного действующего вещества является *терапевтический индекс*, отражающий, в первую очередь, безопасность его применения. Терапевтический индекс определяется как отношение максимальной дозы, не вызывающей нежелательных побочных (как правило, токсических — вплоть до летальных) эффектов, к минимальной фармакологической дозе препарата, обеспечивающей целевой эффект. Очевидно, что с точки зрения безопасности и «запаса» для преодоления возможной устойчивости предпочтительным является как можно более высокое значение такого индекса. Непосредственно терапевтический индекс оценивается *in vivo* на уровне действия вещества на целый организм; тем не менее, уже на этапе *in vitro* можно предварительно провести аналогичный расчёт. Полученные на основе витральных экспериментов индексы во избежание путаницы обычно называют *индексами селективности*.

На основании расчета индексов селективности было установлено, что оптимальными свойствами обладают аналоги бактенецина. Хорошие показатели продемонстрировал и ПГ1, за счет высокой антимикробной активности. На основании анализа полученных результатов мы продолжили работу по созданию новых структурных аналогов для получения еще более эффективных препаратов; параллельно проводя исследование стабильности пептидов в биологических жидкостях и возможности развития к ним микробной резистентности.

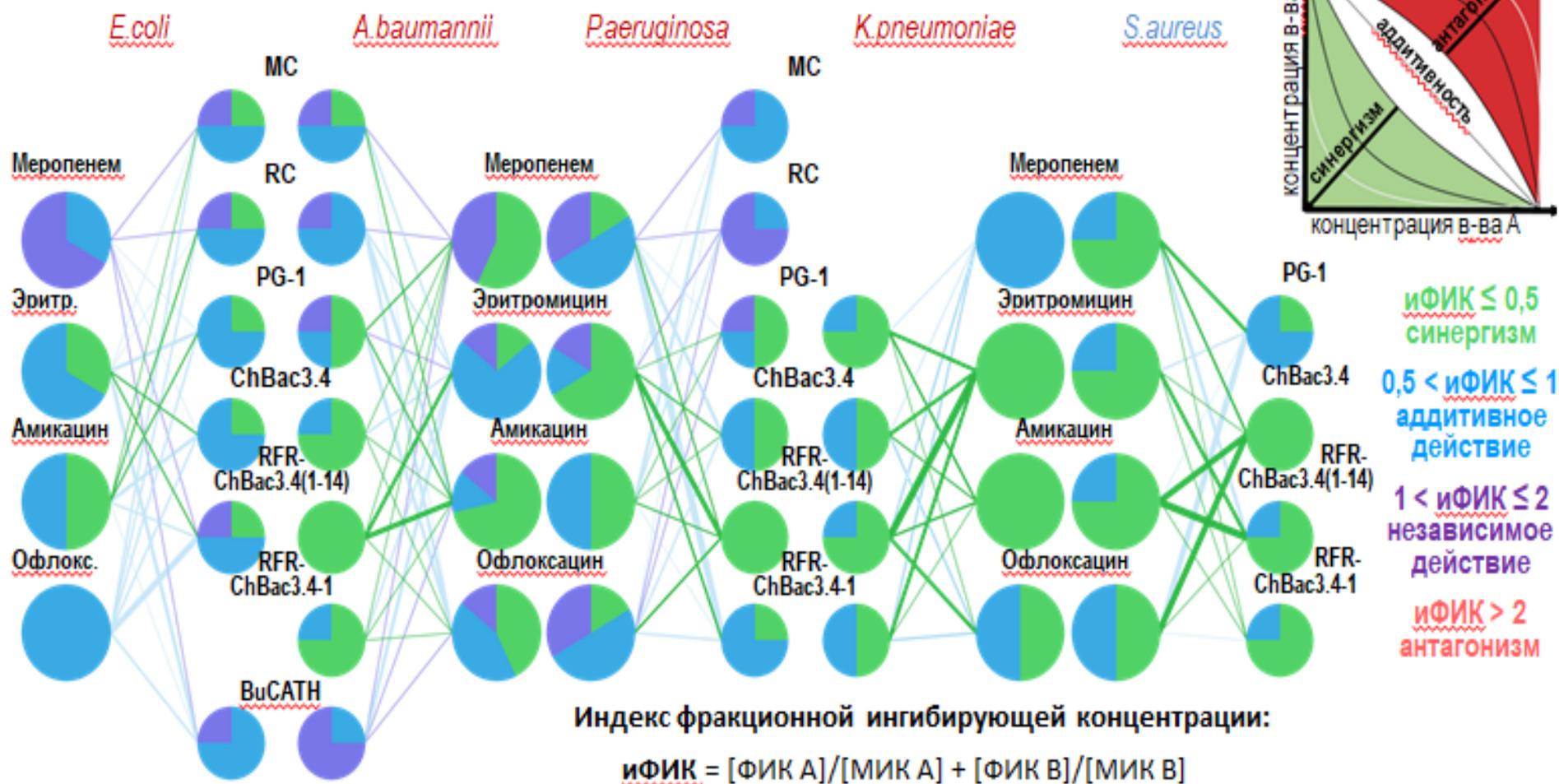
### **Сочетанное действие АМП с другими антимикробными агентами**

Одним из подходов для повышения антимикробной активности пептидов является их сочетанное применение с другими антимикробными агентами — антибиотиками, применяющимися в медицине, антисептиками,



наночастицами серебра. Наличие синергических эффектов в отношении бактерий позволяет снизить эффективные дозы, расширить спектр активности и уменьшить риск развития к пептидам микробной резистентности. Ведь зачастую, когда мы конструируем новую молекулу, не повреждающую клетки макроорганизма, таким образом снижаем мембранолитические свойства и быстроту антимикробного эффекта,

## Полигонограммы совместного действия АМП и антибиотиков



Zharkova et al., 2019. Frontiers in Cell. Infect. Microbiol.

МИК – минимальная концентрация, визуально полностью ингибирующая рост микроорганизма.

ФИК A/B – фракциональные концентрации в-в А и В в смеси, оказывающей аналогичный эффект.

Рисунок 2. Характеристика сочетанного действия антимикробных пептидов и применяемых в медицине антибиотиков

повышая сродство к внутриклеточным мишеням. В результате бактерии могут получить шанс выработать резистентность к АМП. При использовании комбинированных препаратов этих проблем можно избежать.

Совместное действие данных АМП было оценено в комбинациях с антибиотиками различных классов (аминогликозидов, карбопенемов, фторхинолонов, макролидов и др.) в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, в том числе полирезистентных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, устойчивых к большинству выбранных антибиотиков, на модели *in vitro*. На Рисунке 2 – пример результатов по оценке совместного действия АМП и антибиотиков. Для пролин-богатых пептидов бактенецинов выявлено заметно большее число случаев синергизма, чем для бета-спилечных пептидов. Возможно, это связано с двойным механизмом действия, свойственным пролин-богатым пептидам: не только мембранолитической активностью, но и способностью нарушать белковый синтез. Также важно подчеркнуть, что многократное повышение антимикробной активности наблюдалось даже в случае комбинирования пептидов с антибиотиками, к которым бактерии имели низкую чувствительность. Данный факт подтверждает перспективность комбинирования АМП и антибиотиков для преодоления микробной резистентности к последним. Наиболее выраженные эффекты наблюдались при сочетанном действии пептидов с аминогликозидами и эритромицином. Интересно, что данные антибиотики также нацелены на нарушение рибосомального синтеза белков в микробной клетке.

Учитывался и риск усиления цитотоксического действия в комбинациях АМП с антибиотиками. Но даже в максимальных концентрациях, использованных при анализе сочетанного противомикробного действия, гемолитический эффект не превышал 10%, в том числе для новых бета-спилечных пептидов МС и РС, имеющих мембранолитический механизм действия. Таким образом, исследуемые АМП и антибиотики усиливают антимикробные эффекты друг друга, но не усиливают побочные цитотоксические эффекты в отношении нормальных клеток человека.

Основной вклад в представленную работу по оценке совместного действия АМП и различных антимикробных соединений внесла Мария Сергеевна Жаркова, которая уже много лет ведет это направление.

Исследовано и совместное действие пептидов с наночастицами серебра. Использовали различные варианты наночастиц: стабилизированные

желатином, цистеином, олеатом натрия, полиэтилен-гликолем, растительными компонентами. Наночастицы были охарактеризованы и предоставлены для исследования сотрудниками Института химии силикатов им. Гребенщикова, Тверского государственного университета, компании ЗАО «Наноиндустрия», ряд образцов был куплен у фирмы Nanomaterials&Technologies. Некоторые наночастицы серебра (AgНЧ) сами проявляли цитотоксичность в экспериментах *in vitro*. Было показано, что гемолитическую активность проявляют AgНЧ, имеющие острые грани (в отличие от сферических частиц), а также некоторые AgНЧ, в состав которых входят токсичные детергенты. Эксперименты ставили с AgНЧ, не проявляющими значимой цитотоксической активности для клеток человека. Показаны случаи синергизма совместного действия для комбинаций покрытых желатином AgНЧ с протегрином 1, лизоцимом, в меньшей степени с пролин-богатыми пептидами; для цистеин-серебрянных наночастиц — с большинством тестируемых пептидов, как бета-шпилечных - ПГ-1, шучина 4 и РС, так и пролин-богатых пептидов.

Кроме совместного действия AgНЧ и пептидов исследовали их комплексы, где пептиды служили и дополнительным стабилизатором, и действующим началом. Конъюгаты антимикробных пептидов и белков с наночастицами серебра (AgНЧ) были получены сотрудниками ФГБУ «Институт химии силикатов» им. А.В. Гребенщикова РАН методом УФ-восстановления серебра в присутствии данных пептидов или белков и желатина согласно ранее разработанному для конъюгатов наночастицы серебра/лизоцим/желатин протоколу (патент РФ № 2502259). Оболочка конъюгатов в дополнение к стабилизатору-желатину включала один из выбранных антибактериальных пептидов или белков: протегрин-1 свиньи, индолицидин коровы, лизоцим из белка куриных яиц, протамин лосося или смесь гистонов тимуса теленка. Указанные соединения были подобраны по принципу разнообразия структуры и механизма действия. Для сравнения использовали наночастицы, покрытые только желатином. Большинство конъюгатов демонстрировали повышенную антимикробную активность как в сравнении с наночастицами, покрытыми только желатином, так и с антимикробными пептидами и белками в неконъюгированном состоянии, что подтверждает сохранение синергетического потенциала при конъюгировании. Для комплекса AgНЧ с мембранолитическим пептидом протегрином-1 показан лучший результат среди протестированных соединений. При этом гемолитическая активность комплекса протегрина с AgНЧ существенно снижалась по сравнению со свободным пептидом.

Еще одним направлением исследований стало изучение совместного действия АМП с антисептиками. Антисептики широко применяются при местной терапии гнойно-воспалительных процессов, они, как правило, обладают менее специфическим механизмом антимикробного действия, чем антибиотики, за счёт чего менее подвержены угрозе развития к ним микробной резистентности.

Совместное действие с антисептиками было проанализировано для мембранолитического бета-спилечного АМП протегрина-1, пролин-богатого пептида Вас3.4, обладающего двойным (мембранолитическим и внутриклеточным) типом действия, а также его укороченного аналога Вас3.4-2, действующего в большей степени на внутриклеточные мишени. Из антисептиков были рассмотрены гипохлорит натрия, диоксидин (производное хиноксалина, нарушающее синтез нуклеиновых кислот), повииаргол (препарат коллоидного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном, пронтосан (комбинация полигексанида и амфотерного ПАВ ундециленового амидопропилбетаина), этидроновая кислота (бисфосфонат, для которого была выявлена противомикробная активность и способность ингибировать бактериальные бета-лактамазы). Также было исследовано сочетанное действие АМП с поверхностно-активными веществами (ПАВ): анионогенным ПАВ лаурилсаркозинатом натрия и амфотерным ПАВ кокоамидопропилбетаином (близким по химической структуре к ундециленовому амидопропилбетаину, входящему в состав пронтосана). ПАВ являются компонентами многих дезинфектантов и других гигиенических продуктов: шампуней, зубных паст и т.п.

При исследовании антибактериального действия сочетаний АМП с выбранными антисептиками и ПАВ, в отличие от совместного действия с антибиотиками, было обнаружено сразу два случая устойчивого антагонизма: с гипохлоритом натрия и с лаурилсаркозинатом натрия, что может объясняться, в первую очередь нейтрализацией положительного заряда пептидов в присутствии отрицательно заряженных структур (молекул ПАВ, формирующих мицеллы, или гипохлорит-анионов). Выявленный антагонизм подчёркивает важность учёта возможности таких ослабляющих эффектов как при подборе компонентов при дизайне комплексного препарата, так и в перспективе, при планировании сочетания различных терапевтических мероприятий при проведении лечения или клинических испытаний, где новый препарат применяется в дополнение к стандартной схеме лечения.

Взаимодействие АМП с другими рассматриваемыми соединениями характеризовалось в основном аддитивностью или синергизмом. Наиболее широко и универсально для всех АМП синергизм проявлялся при сочетанном действии с препаратом серебра повидон-йодом и амфотерным ПАВ амидопропилбетаином. Взаимное усиление эффектов АМП и амидопропил бетаина возможно происходит за счёт усиления мембранолитической активности.

Известно, что наиболее серьезную проблему для практической медицины представляют микроорганизмы, формирующие биопленки на различных поверхностях, в том числе находящихся в живых организмах. В составе биопленок бактерии приобретают повышенную резистентность к антибиотическим препаратам. Поэтому в настоящее время усилия ученых направлены именно на разработку веществ, проявляющих антибиопленочную активность. Оказалось, что ряд исследуемых нами АМП (протегрин 1, пролин-богатые АМП) обладает способностью в субмикробоцидных концентрациях препятствовать формированию бактериальных биопленок (показано для антибиотикорезистентных клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*). Было проанализировано совместное антибиопленочное действие АМП с антибиотиками (в том числе теми, к которым бактерии имели резистентность) или антисептиками, использовались комбинации и соотношения действующих веществ, для которых был показан синергизм в отношении планктонных (свободно плавающих) бактерий.

Присутствие антибиотиков, однако, оказывало слабое влияние на субмикробоцидные эффекты АМП. Выраженный эффект был обнаружен только для сочетания одного из пролин-богатых пептидов Vas3.4-2 с меропенемом — в присутствии антибиотика концентрации пептида, необходимые как для полного, так и для более чем половинного (>50%) подавления формирования биоплёнки снижались в 4 раза.

Выраженный синергизм противобиопленочного действия для субмикробоцидных концентраций был выявлен для сочетаний практически всех протестированных АМП с пронтосаном и с кокоамидопропилбетаином. При этом пронтосан в своём составе в качестве вспомогательного компонента также имеет амидопропил бетаин, исходя из чего можно предположить, что именно этот компонент играет ведущую роль в обнаруженном синергетическом взаимодействии с АМП против формирующихся биоплёнок. Вероятным механизмом может служить затруднение первичной адгезии бактериальных клеток к контаминируемым поверхностям.

Полученные данные подтверждают эффективность АМП и антисептиков как противобиоплёточных агентов и свидетельствуют, что их антибиоплёточные свойства могут дополнительно усиливаться в присутствии друг друга.

Таким образом, комбинирование АМП с антибиотиками и антисептиками можно рассматривать как перспективную стратегию для преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов. Синергетические сочетания показывают быстрый антимикробный эффект, позволяющий препятствовать формированию микробных биоплёнок. Наиболее перспективными для создания комбинированного препарата представляются антибиотики групп аминогликозидов и макролидов, ингибирующие синтез белка на рибосомах. Среди пептидов предпочтительными с точки зрения низкой токсичности являются пролин-богатые пептиды, однако бета-шпилечные пептиды при этом сохраняют преимущество более высокой устойчивости в биологических средах (в частности — к действию протеаз). Можно считать целесообразным усиление комбинации за счёт добавления амфотерных или других (но не анионогенных) ПАВ.

Эффективность исследуемых пептидов и их комбинаций с другими соединениями проверяются и в экспериментах *in vivo* — на модели инфицированной полнослойной кожной раны у мышей — исследуется влияние обработки раневой поверхности пептидами на динамику заживления раны. Наиболее хорошие результаты к данному моменту показаны для пролин-богатого пептида — аналога бактенецина 5 и его комбинаций с наночастицами серебра.

В настоящее время работа продолжается, создаются новые структурные варианты пептидов для достижения еще более высоких показателей активности, а также повышения стабильности пептидов. Используются разные подходы: внесение D-аминокислот (в первую очередь, D-аргинина — для повышения устойчивости к действию трипсиноподобных протеаз), модифицирование N-конца молекул (внесение различных ацильных групп или других компонентов), модификации C-концевой аминокислоты с добавлением разнообразных химических групп, циклизация пептидной связи, получение химерных молекул, то есть объединение в одном пептиде фрагментов разных АМП, имеющих различные мишени и др., конъюгация с антибиотиками, полиэтиленгликолями, наночастицами. Хочется верить, что в ближайшее время получение «продукта» для медицинского применения станет реальностью.

В мире попытки внедрить АМП в медицинскую практику проводятся давно, много пептидных препаратов находится на различных стадиях клинических испытаний, правда, процесс этот идет не быстро, и внедрены в медицину пока, в основном, только пептидные антибиотики микробного происхождения или антимикробные белки (лактоферрин, лизоцим, миелопероксидаза и др.). При этом, в нашей стране ситуация с внедрением в медицину АМП животных даже более обнадеживающая, чем за рубежом. В аптеках уже давно можно приобрести препарат Аллоферон (иммуномодулятор, созданный Сергеем Ивановичем Чернышом и коллегами на основе цитокина насекомых) и препараты на основе пролин-богатых пептидов насекомых, выпускаемые фирмой «Аллофарм»; вагинальные свечи «Суперлимф», содержащие антимикробные компоненты лейкоцитов домашней свиньи, в том числе, протегрины; различные иммуномодулирующие соединения, содержащие пептиды – продукты гидролиза молока или молозива коров и другие препараты.

Мы надеемся, что и наши пептидные препараты займут свое место в ряду новых антибиотических средств. Ведь эффективность их высока. Поэтому применение вполне оправдано - в случае неэффективности стандартных схем химиотерапии, использование таких препаратов позволит решить ряд проблем, связанных с тяжелыми нозокомиальными инфекциями, вызываемыми антибиотикорезистентными бактериями. Разрабатываемые пептиды пока планируется использовать как средства местного применения - для обработки инфицированных ран, в том числе ожоговых ран, трофических язв, при инфекционном процессе, протекающем при синдроме диабетической стопы, и т.п. Такие препараты можно будет использовать в стационарах хирургического, урологического, травматологического профиля, отделениях и центрах онкогематологии, ожоговых центрах, отделениях реанимации и интенсивной терапии. Кроме того, антибактериальные покрытия, включающие антимикробные пептиды, могут применяться при создании различных изделий медицинского назначения – для обработки катетеров, стентов, стоматологических имплантов и пр.

Кроме антимикробного препарата, о котором шла речь в докладе, в отделе идут работы и по использованию других свойств пептидов – в лаборатории иммунопатофизиологии исследуется нейропротекторное действие АМП, в лаборатории общей патологии изучается взаимодействие АМП с системой комплемента, получены данные о пептидах, которые могут служить ингибиторами этой системы (что востребовано при определенных видах патологии). Создана новая молодежная **лаборатория**

**противоопухолевых пептидов**, которую возглавила Мария Сергеевна Жаркова – талантливый молодой ученый.

В этом докладе я постаралась осветить все этапы наших работ с пептидами и попытки перейти от фундаментальных исследований в области пептидомии к практической медицине. Конечно, в реальности предстоит сделать еще много шагов - провести характеристику фармакологических параметров, найти коммерческих партнеров для финансирования доклинических и клинических испытаний и т.п. Но цель поставлена, и мы будем к ней стремиться.

Хочу поблагодарить всех сотрудников Отдела общей патологии и патофизиологии и Лаборатории альтернативных антимикробных биопрепаратов НЦМУ за огромный энтузиазм и каждодневный кропотливый труд, за сплоченность и взаимоподдержку!

За долгие годы работы в ИЭМе я имела счастье работать в дружественной, теплой обстановке, и очень благодарна всем членам нашего коллектива за поддержание такого же благоприятного климата, который поможет нам справиться со всеми трудностями и решить поставленные задачи.

Очень признательна и сотрудникам других отделов Института за помощь в проведении наших исследований!

