

На правах рукописи

ВЛАДИМИРОВА
Елизавета Васильевна

**КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ
РАНЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

3.3.3 – патологическая физиология
1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2026

Работа выполнена в отделе общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Научные руководители:

доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент РАН Шамова Ольга Валерьевна
кандидат биологических наук Жаркова Мария Сергеевна

Официальные оппоненты:

Рыжак Галина Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор, заведующая отделом клинической геронтологии и гериатрии Автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательского центра «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Линник Станислав Антонович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры травматологии, ортопедии и военно-полевой хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71, лит. Е.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12В и на сайте <https://iemspsb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Суфиева Дина Азатовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Поиск новых эффективных средств борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами является актуальной задачей современной медицины. В числе наиболее опасных микроорганизмов, отнесенных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) к критически приоритетной группе патогенов (WHO, 2024), выделяются карбапенем-резистентные штаммы *Acinetobacter baumannii*, резистентные к карбапенемам или цефалоспорином III поколения представители *Enterobacterales* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp.) и рифампицин-резистентные штаммы *Mycobacterium tuberculosis*. Список данных патогенов пересекается с группой ESKAPE, включающей *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp, которые, как известно, являются одними из основных возбудителей лекарственно-устойчивых нозокомиальных инфекций. Обмен механизмами устойчивости между данными патогенами в условиях медицинских учреждений приводит к появлению мульти- и панрезистентных штаммов, что значительно усложняет борьбу с инфекциями (Тимошевский, 2023; Афиногенова и др., 2017; WHO, 2024; Ho et al., 2025; Pendleton et al., 2013).

Образование хронических незаживающих ран, вызванных такими микроорганизмами, представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения и создает значительную финансовую нагрузку, так как обуславливают увеличение срока госпитализации больного и нередко заканчиваются летальным исходом (Найговзина и др., 2018; de Souza et al., 2022; Netta et al., 2024; Magana et al., 2020).

Таким образом, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, особенно раневые инфекции, представляют серьезную угрозу жизни и здоровью человека в условиях роста антибиотикорезистентности микроорганизмов. Поэтому борьба с устойчивыми бактериями является одной из ключевых задач медицины, поскольку традиционные антибиотики становятся менее эффективными, а лечение инфекций требует новых терапевтических подходов.

В поисках кандидатов на роль альтернативных антимикробных средств для терапии инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями, в настоящее время внимание ученых все больше привлекают антимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета, которые обладают быстрым антибактериальным действием, направленным на несколько мишеней в клетках микроорганизма, с низкой вероятностью формирования к ним резистентности, эффективностью против биопленок, а также иммуномодулирующими свойствами (Netta et al., 2024; Magana et al., 2020).

В целом, разработка новых путей этиологической, патогенетической и саногенетической терапии с применением АМП животных, анализ механизмов реализации ими защитных реакций, определение роли пептидов врожденного иммунитета в саногенезе является важной задачей патофизиологии и фундаментальной и практической медицины. Как средства этиологической терапии пептиды могут действовать напрямую, инактивируя бактериальные клетки, устраняя причину болезни. С точки зрения применения в патогенетической терапии перспективно создание на основе АМП иммуномодулирующих соединений, опосредованно способствующих реализации защитных функций, коррекции

последствий патологического процесса в целом. Некоторые АМП могут рассматриваться и как факторы саногенетической терапии из-за их способности к активации защитных, компенсаторных, репаративных и других адаптивных процессов. Таким образом, разработка подходов к внедрению АМП животных в практическую медицину обладает несомненной актуальностью.

Степень разработанности темы. Большое число научных коллективов работает над созданием антибиотических препаратов на основе природных АМП многоклеточных организмов, однако широкого применения в прикладной медицине такие пептиды еще не нашли. Данные о клинических испытаниях средств на основе пептидов животного происхождения пока что немногочисленны, и лишь единичные препараты вышли на рынок (например, "Энтомикс" (Зиновьев и др., 2015) и "Аллоферон" на основе пептидов насекомых (Arriah et al., 2024), "Суперлимф", включающий протегрины свиньи (Юшкова и др., 2023)). На основе АМП микробного происхождения, в свою очередь, доступен ряд антибиотиков: бацитрацин, даптомицин, колистин, грамицидин D, далбаванцин, оритаванцин, полимиксин В, ванкомицин и телаванцин, тейкопланин. Однако АМП животных имеют ряд преимуществ по сравнению с пептидами микроорганизмов. Как уже упоминалось, многие пептиды обладают дополнительным влиянием на организм пациента: иммуномодулирующей, ранозаживляющей активностью, а их механизм действия считается более плюрипотентным, направленным на множественные мишени, что препятствует развитию микробной резистентности, тогда как для большинства микробных пептидных антибиотиков случаи появления устойчивости у патогенов уже зафиксированы (Alzain et al., 2025; Mangoni et al., 2016).

Для практического использования АМП животных существует ряд проблем, включая недостаточную селективность действия наиболее активных пептидов по отношению к бактериальным клеткам, вследствие чего возможно повреждение также и клеток макроорганизма. Одним из путей преодоления этого ограничения является создание синтетических аналогов природных пептидов, имеющих более широкое терапевтическое окно. Работа ведется также в направлении повышения стабильности пептидов в биологических системах. Еще одной важной задачей является налаживание методов широкомасштабного производства модифицированных АМП со сниженной затратностью (Lohumi et al., 2025). Рассматриваются возможности создания пептидомиметиков, комплексов с различными соединениями (полиэтиленгликолями, наноматериалами и др.), использования специальных средств доставки, например, липосом и наноконтейнеров (Chi et al., 2025). Альтернативный подход строится на идее использования пептидов в сочетании с другими антимикробными препаратами для синергетического усиления эффекта. Сочетанное применение различных антимикробных агентов является одной из распространенных стратегий для преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов (Афиногенова и др., 2023; Jenssen et al., 2006; Lohumi et al., 2025). Кроме того, такой подход позволяет снизить действующие концентрации и, соответственно, как побочные эффекты, так и стоимость, обусловленную пептидной компонентой.

Настоящее исследование построено в рамках последней парадигмы и представляет собой один из этапов разработки многокомпонентного комбинированного антимикробного препарата на основе АМП животных – *объектов данного исследования*. В качестве

совместно применяемых с пептидами антимикробных агентов в данной работе рассматриваются другие *объекты исследования* – наночастицы серебра, антибиотики и антисептики. Препараты, содержащие комбинации синтетических аналогов природных антимикробных пептидов, наночастиц серебра, антисептиков и конвенциональных антибиотиков, с высокой вероятностью будут активны в отношении широкого спектра антибиотикорезистентных бактерий, эффективны в отношении бактериальных биопленок и смогут служить для наружного применения в терапии госпитальных инфекций, развивающихся после хирургического вмешательства, применяться для обработки катетеров и иных изделий медицинского назначения, при синдроме диабетической стопы и других видах патологии. Данное научное направление связано с решением задач патофизиологии – разработкой новых путей этиотропной и патогенетической терапии инфекционных заболеваний. Работа проводилась на стыке двух дисциплин – патофизиологии и биохимии. Биохимическая направленность связана с исследованиями в рамках пункта паспорта специальности «Биохимия»: «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине».

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлась разработка прототипов новых комбинированных препаратов на основе синтетических аналогов природных антимикробных пептидов животного происхождения для применения в терапии раневых инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести химический синтез антимикробных пептидов различной структуры, отобранных на основе литературных данных;
2. Осуществить анализ антимикробной активности химически синтезированных аналогов пептидов врожденного иммунитета *in vitro* в отношении антибиотикорезистентных бактерий, включая клинические штаммы, полученные из инфицированных ран пациентов;
3. Провести оценку цитотоксического эффекта исследуемых пептидов на клетки человека *in vitro* и рассчитать индексы селективности;
4. Изучить совместное антимикробное действие исследуемых пептидов в комбинации с антибиотиками, антисептиками и наноматериалами (наночастицы серебра), определить комбинации, в которых имеется синергический эффект. Установить, связан ли механизм антибактериального действия исследуемых веществ и их комбинаций с нарушением барьерной функции бактериальных мембран;
5. Изучить влияние исследуемых веществ и их комбинаций на формирование биопленки антибиотикорезистентными бактериями;
6. Исследовать действие комбинированных препаратов на клетки человека *in vitro* с целью выявления возможных цитотоксических эффектов и отбора комбинаций, наиболее безопасных для клеток человека;
7. Исследовать действие комбинаций антимикробных пептидов, антибиотиков, антисептиков или наноматериалов на заживление инфицированных ран лабораторных животных (оценка динамики сокращения площади раневой поверхности и гистологическое исследование тканей в области раневого дефекта в ходе репаративного процесса).

Научная новизна. В данной работе впервые выполнено комплексное сравнительное исследование совместного действия антимикробных пептидов различных структур (пролин-богатые пептиды и пептиды со структурой β -шпильки), антибиотиков, антисептиков и наночастиц серебра на бактериальные и эукариотические клетки. Проведено изучение антимикробного потенциала и некоторых цитотоксических свойств новооткрытых пептидов мицелина и рицецина. Показана выраженная антимикробная активность этих АМП и установлен мембранолитический характер действия на микробные клетки, а также выраженная селективность их эффектов в отношении микроорганизмов.

Впервые последовательно выполнен анализ совместного антибактериального действия двухкомпонентных комбинаций АМП и антимикробных средств непептидной природы и характеристика биологической активности многокомпонентных систем, включающих соединения, с которыми АМП в двухкомпонентных композициях проявили синергичное антимикробное действие. Получена новая информация о перспективности применения комбинированных препаратов для предотвращения формирования биопленок. Впервые доказана эффективность исследуемых многокомпонентных комбинаций в ускорении заживления ран у лабораторных мышей *in vivo*, выбраны оптимальные композиции, при использовании которых подтверждено антимикробное и ранозаживляющее действие в экспериментальной модели раневой инфекции у лабораторных животных. На основе полученных результатов предложены перспективные комбинации, которые могут лечь в основу разработки новых высокоэффективных антибактериальных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Исследование вносит важный вклад в понимание молекулярных механизмов действия антимикробных пептидов разных структурных классов на бактериальные и эукариотические клетки, взаимодействия пептидов с различными антимикробными агентами – антибиотиками, антисептиками и наноматериалами; что расширяет знания о фундаментальных основах реализации противoinфекционной защиты с участием как природных молекул, так и лекарственных средств, раскрывает значимость синергии в борьбе с антибиотикоустойчивыми бактериями, в том числе формирующими биопленки. Полученные знания о совместных эффектах создают теоретическую основу для развития новых направлений в создании эффективных и безопасных комбинированных антимикробных агентов.

Работа имеет прикладное значение, так как направлена на создание новых средств для применения в терапии раневых инфекций. В ходе исследования подобраны комбинации антимикробных пептидов, антибиотиков, антисептиков и наноматериалов, перспективных с точки зрения практического применения: активных в отношении актуальных патогенов группы ESKAPE, играющих важную роль в патогенезе трудноизлечимых раневых инфекций, и не проявляющие значимую цитотоксичность для клеток человека. Доказана перспективность их применения в лечении инфицированных ран и предотвращении формирования биопленок, что является важным аспектом этиотропной терапии. Данные комбинированные препараты могут рассматриваться в качестве прототипов новых лекарственных средств для обработки ран.

Методология и методы исследования. В исследовании применены современные патофизиологические и биохимические методы и модели (химический синтез, обращенно-

фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, различный спектр методов для определения антимикробной активности индивидуальных соединений и их комбинаций, характеристика биопленкообразования, методики для оценки цитотоксичности в отношении клеток высших эукариот, эксперименты на модели *in vivo* на лабораторных животных, гистологическое исследование).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Исследуемые пептиды со структурой β -шпильки и большинство пролин-богатых пептидов обладают высокой антимикробной активностью в отношении мультирезистентных бактерий, в том числе клинических штаммов из инфицированных ран пациентов.

2. Пептиды PR-39, протегрин-1, рицецилин, мицецилин, бактенецин 3.4 и его модификация RFR-ChVac3.4(1-14), имеют наиболее высокие индексы селективности среди исследуемых пептидов, т.е. обладают наилучшим терапевтическим потенциалом.

3. Совместное действие отобранных с учетом индекса селективности АМП с антимикробными агентами в определенных двойных и многосоставных комбинациях характеризуется синергизмом. Антибиотики, наночастицы серебра и антисептики взаимно усиливают эффекты пептидов, что позволяет снизить их действующие концентрации.

4. АМП и их комбинации эффективно подавляют формирование биопленок антибиотикорезистентными бактериями. Многосоставные комбинации антибиотиков и хлоргексидина с пептидами PG-1 и PR-39, MC и PR-39, RFR-ChVac3.4(1-14) и ChVac5(20-43) оказывают наиболее выраженный эффект на подавление формирования биопленки, при этом в большинстве случаев сохраняется безопасность препаратов для клеток человека.

5. Комбинированные препараты, включающие RFR-ChVac3.4(1-14) в комбинации с пептидом ChVac5(20-43); мицецилин в комбинации с пептидом PR-39; протегрин-1 с PR-39, а также PR-39 с Ag/НАЦ 10, оказывают положительное влияние на заживление инфицированных ран мышей, что подтверждает перспективу их практического применения в качестве новых антимикробных средств для применения в терапии раневых инфекций.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты диссертационного исследования достоверны благодаря проведению серии независимых экспериментов с достаточным количеством повторов, формированию контрольных групп (отрицательного и положительного контроля) и применению современных методов статистического анализа.

Результаты диссертационного исследования представлены на научных конференциях и конкурсах: XXVII, XXVIII, XXIX Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием "Актуальные проблемы биомедицины – 2021 / 2022 / 2023" (Санкт-Петербург, 2021-2023 г.), Всероссийская конференция "От микробиологии к генетическим технологиям" (Новосибирск, 2023 г.), III, IV International Mini-Conference "Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics" (Saint-Petersburg, 2023, 2024 г.), Всероссийская научная школа "Медицина молодая". II научно-образовательный форум (Москва, 2023 г.), IX Всероссийский молодежный научный форум "Наука будущего – наука молодых" (Самара, 2024 г.), VI Всероссийская научная Конференция молодых ученых "Медико-биологические аспекты химической безопасности" (Ленинградская область, 2025 г.), Всероссийская научно-практическая конференция "Экспериментальная медицина", посвященная 135-летию Института экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, 2025 г.).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликована 31

научная работа, из которых 9 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, и/или в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus/Web of Science, 1 статья в журнале, входящем в РИНЦ, и 21 тезисы докладов. Зарегистрировано 2 патента на изобретение.

Личный вклад соискателя в проведение исследования. Поиск и анализ отечественной и зарубежной литературы, планирование и проведение всех основных этапов экспериментальной части работы, манипуляции с лабораторными животными, обработка и интерпретация результатов выполнялись автором лично. Гистологическое исследование проводилось при участии и консультировании сотрудников отдела общей патологии и патологической физиологии. Автор активно участвовал в подготовке публикаций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 192 страницах машинописного текста, содержит 37 таблиц, 58 рисунков и 2 приложения. Работа состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы (285 источников) и список опубликованных работ по теме диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: химически синтезированные пептиды со структурой β -шпильки: протегрин-1 (PG-1), шучин-4 (Shu-4), мицецилин (MC), рицецилин (RC), ареницин 1 (AR1), аналог ареницина 1 (AR1a); пролин-богатые пептиды: астацидины 2 (AC2) и PcAst-1b/c (PcAst), бактенецин 3.4 (ChVac3.4), его модификации RFR-ChVac3.4(1-14) и RFR-ChVac3.4-1-NH₂, фрагмент бактенецина 5 (ChVac5(20-43)), PR-39 и buCATHL4D.

Синтез пептидов. Синтетические аналоги природных антимикробных пептидов и их модификаций были *получены методом твердофазного пептидного синтеза* с использованием Fmoc/tBu-стратегии в лаборатории дизайна и синтеза биологически активных пептидов отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ "ИЭМ". Чистоту полученных пептидов оценивали *методом аналитической ОФ-ВЭЖХ*, а соответствие молекулярных масс – *масс-спектрометрическим анализом MALDI-TOF* (выполнен к.ф.м.н. Забродской Я.А. в ФГБУ "НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева" Минздрава России).

Концентрацию пептидов определяли спектрофотометрически, используя *коэффициенты молярной экстинкции*, рассчитанные для каждого пептида, при длине волны 280 нм (для пептидов, содержащих триптофан и тирозин) или 214 нм.

Исследуемые соединения. В работе использовали антимикробные агенты:

– наноструктурные препараты серебра: повииаргол (стабилизирован поливинилпирролидоном) (ФГУП "СКТБ "Технолог", Россия), наночастицы серебра, стабилизированные олеатом натрия (AgNP/ OleNa), полиэтиленгликолем 1500 (Ag/PEG 1500), (Nanomaterials&Technologies M9, Россия), цеолитом β , (β /Ag^o-5% – содержание наночастиц серебра в матрице 5%) (любезно предоставлены научной группой Голубевой О.Ю., Институт химии силикатов им. И.В. Гребенщикова, Санкт-Петербург), ацетилцистеин-серебряные растворы (Ag / НАЦ 8 и Ag / НАЦ 10) (любезно предоставлены научной группой Вишневецкого Д.В., ТвГУ, Тверь);

– антибиотики: амикацин, эритромицин, офлоксацин, меропенем, оксациллин (Sigma, США).

– антисептики: пронтосан (Б.Браун, Германия), хлоргексидин (ЮжФарм, Россия),

бетадин (ЗАО "Фармацевтический завод Эгис", Венгрия), кокобетаин (Evonik Industries, Германия).

Штаммы микроорганизмов. Использовали антибиотикоустойчивые клинические изоляты бактерий: *P. aeruginosa* MDR 522/17, *S. aureus* 1399/17, *K. pneumoniae* ESBL 344/17, *A. baumannii* 7226/16, *E. coli* ESBL 521/17, *S. aureus* (клин.изол.), *A. baumannii* 16.63 (BMA) (16), *K. pneumoniae* 1321, *A. baumannii* 769.2 (BMA), *S. maltophilia* 414 (BMA), *K. pneumoniae* 5156, *K. pneumoniae* 5159, *A. baumannii* 5155, *A. baumannii* 5159, *A. baumannii* 5174, *Klebsiella* spp. 717, *A. baumannii* 554; смешанные культуры микроорганизмов из раневого отделяемого пациентов; лабораторные штаммы *E. coli* ML-35p, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 33591.

Методы оценки антимикробного действия веществ на бактериальные клетки.

Антимикробную активность веществ и их комбинаций определяли *методом серийных разведений в жидкой питательной среде* (Shafer, 1997) – бульоне Мюллера–Хинтон. Наименьшая концентрация, при которой отсутствовал видимый рост бактерий, считалась минимальной ингибирующей концентрацией (МИК). В работе приведены медианные значения МИК и их геометрическое среднее по набору штаммов (ГМИК).

Совместную антимикробную активность оценивали путем *серийных разведений по методу "шахматной доски"* (Orhan et al., 2005; Ruden et al., 2009). Характер совместного действия веществ А и В определяли по индексу фракционной ингибирующей концентрации иФИК= $[A]/[МИК_A] + [B]/[МИК_B]$, где [А] и [В] – концентрации веществ А и В в комбинации, ингибирующей рост бактерии; [МИК_А] и [МИК_В] – МИК веществ А и В, соответственно. Эффект считали синергетическим, если иФИК ≤ 0,5; аддитивным, если 0,5 < иФИК ≤ 1; независимым, если 1 < иФИК ≤ 2, и антагонистическим, если иФИК > 2.

Влияние препаратов на проницаемость мембран *E.coli* ML35p для хромогенных маркеров определяли спектрофотометрически (Lehrer et al., 1989; Артамонов и др. 2008). Если цитоплазматическая (и наружная) мембрана *E. coli* ML35p становится проницаемой для хромогенного маркера *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG) из-за повреждения исследуемыми веществами и их комбинациями, то в результате ферментативной реакции, катализируемой β-галактозидазой, образуется *o*-нитрофенол, который имеет максимум поглощения при длине волны 420 нм. Поэтому о способности препаратов вызывать рост проницаемости цитоплазматической мембраны судили по увеличению оптической плотности (OD) проб при длине волны 420 нм, которую измеряли раз в минуту в течение 2 часов при температуре 37 °С и периодическом встряхивании планшета.

Количество формирующихся биопленок оценивали с помощью спектрофотометрии, используя метод окрашивания кристаллическим фиолетовым (Merritt et al., 2005).

Процент подавления образования биопленки рассчитывали по формуле:

$$\text{Подавление образование биопленки (\%)} = 100\% - \frac{OD_{590(\text{пробы})} - OD_{590(\text{контроль среды})}}{OD_{590(\text{контроль бактерий})} - OD_{590(\text{контроль среды})}} \times 100\%$$

Оценка токсического действия веществ на эукариотические клетки.

Способность веществ и их комбинаций повреждать мембраны эукариотических клеток оценивали в *гемолитическом тесте* (Shafer, 1997). После 30-минутной инкубации с 2,5% суспензией эритроцитов человека при 37 °С высвобожденный гемоглобин в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Процент

гемолиза рассчитывали как $(OD_{\text{образца}} - OD_{0\% \text{ лизис}}) / (OD_{100\% \text{ лизис}} - OD_{0\% \text{ лизис}}) \times 100\%$, где 100% лизис – образцы, обработанные 1% раствором Тритона X-100, а 0% лизис – ЗФР.

Жизнеспособность эукариотических клеток под действием исследуемых веществ оценивали с помощью *МТТ-теста*, который позволяет регистрировать общую активность ферментов митохондриального дыхания. МТТ-тест проводили, как описано ранее (Mosmann, 1983). В эксперименте использовали суспензионные культуры клеток – мононуклеары периферической крови человека, полученные из крови здоровых доноров, а также адгезионные культуры клеток – фибробласты кожи человека и эндотелиоциты человека EA.hy926. Мононуклеары вносили в количестве 100 тыс. клеток на лунку в среде RPMI в день эксперимента. Адгезионные культуры высеивали в количестве 30 000 клеток/лунку в среде DMEM-F12 (1:1), содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы, за 20–24 часа до эксперимента для формирования монослоя. В день эксперимента среду заменяли на DMEM-F12 без сыворотки. Данные аппроксимировали сигмовидной кривой доза-эффект с определением ИК₅₀ – 50% ингибирующей концентрации.

Модель раневой инфекции. Самцам мышей F1(CBA×C57Bl/6) массой 24–30 г (Рапполово, Россия) наносили раны под легким эфирным наркозом круглыми скальпелями для биопсий d 6 мм. Получали по 2 резаные полнослойные кожные раны, на которые сразу наносили по 10 мкл суспензии бактерий, включающей по $0,5 \times 10^7$ КОЕ *K. pneumoniae* ESBL 344/17, *P.aeruginosa* MDR 522/17, *S. aureus* 1399/17, за исключением контрольной группы "без бактерии". На следующий день и далее ежедневно наносили по 10 мкл исследуемых комбинаций на гелевой основе (ПЭГ 600 или 0,5% гиалуроновая кислота, содержащая 1 г/мл смеси (330 мг орнитина, 330 мг аргинина, 330 мг лизина/мл) – ГК + OrnRK). Контрольным животным наносили 10 мкл гелевой основы без активных компонентов. Контрольные и опытные группы включали по 6 мышей. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ "ИЭМ" (Протокол № 3/25 от 20.11.2025).

Скорость заживления инфицированной раны оценивали, измеряя площадь раневой поверхности – раны фотографировали и далее использовали программу ImageJ 1.44r (NIH, USA) для работы с фотографиями. Рассчитывали медиану с интерквартильным размахом. Различия групп с инфицированным и неинфицированным контролем и между контролями оценивали по критерию Манна – Уитни с учетом поправки Холма – Бонферрони.

На ряде сроков для проведения *гистологического исследования* мышей подвергали эвтаназии с использованием эфира. Аккуратно иссекали область раневого дефекта с обязательным захватом края раневой поверхности с макроскопически неизменной кожей, заключали в парафиновые блоки. С помощью санного микротомы получали серийные срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону для микроскопического анализа степени отека, инфильтрации клетками воспаления и восстановления структуры кожного покрова (эпидермиса, дермы и гиподермы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор объектов исследования. В текущий проект был включен ряд пептидов, впервые полученных и охарактеризованных в отделе общей патологии и патофизиологии: высокоактивные β-спилечные пептиды протегрин-1, ареницин, а также пролин-богатые пептиды млекопитающих – бактенецины козы и овцы (Kokryakov et al., 1993; Shamova et al., 1999; Shamova et al., 2009; Shamova et al., 2016). Также были отобраны некоторые

аналоги с улучшенными свойствами, полученные в ходе изучения структурно-функциональных особенностей ареницина и некоторых бактенецинов (Orlov et al., 2019; Koreikin et al., 2020). Также исследованы два β -спилечных пептида, структура которых была впервые получена с использованием биоинформатических подходов Игорем Евгеньевичем Елисеевым в рамках совместной работы – мицецилин и рицецилин. На основе анализа литературных данных были отобраны пептиды с наиболее перспективными свойствами с точки зрения применения в медицине – β -спилечный пептид шучин-4, пролин-богатые пептиды – астацидины, обогащенный пролином и триптофаном линейный кателицидин 4 буйвола. Кроме того, в число объектов исследования были включены 2 пролин-богатых пептида PR-39 и ChVac5(20-43) как перспективные ранозаживляющие пептиды (Chan, Gallo, 1998; Gao et al., 2000; Li et al., 2000; Ямщикова и др., 2012; Holani et al., 2016; Назаров и др., 2017; Владимирова Е.В., Сухарева М.С., 2022).

Синтез антимикробных пептидов. Был осуществлен химический синтез пептидов ChVac3.4, PG-1, MC, PR-39 и RFR-ChVac3.4(1-14) методом твердофазного пептидного синтеза. Другие исследуемые пептиды, которые также получены методом твердофазного пептидного синтеза, были предоставлены сотрудниками отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ "ИЭМ". В Табл. 1 приведены основные параметры и результаты синтеза пептидов.

Таблица 1 – Основные параметры синтезируемых пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность	MW, Да	Масштаб синтеза, мМоль	Чистота сырого продукта по ВЭЖХ, %	Выход практический, %	Чистота конечного продукта по ВЭЖХ, %
ChVac3.4	RFRLPFRRPPIRHNPPPFYPPFRRL-NH ₂	3373,94	0,2	79,03	32,8	95,17
RFR-ChVac3.4 (1-14)	RFRRFRLPFRRPPIRHN-NH ₂	2318,39	0,2	58,01	37,7	98,36
MC	ACLRIRVCNRYCYVFLRCF	2556,23	0,2	36,18	16,0	94,45
PG-1	RGRLCYCRRRFCVCVGR-NH ₂	2154,07	0,2	60,46	18,2	97,22
PR-39	RRRPRPPYLPRRPPPFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF-NH ₂	4716,70	0,2	71,26	22,1	98,62

Для разработки прототипов препаратов на основе АМП для применения в терапии раневых инфекций необходимо осуществить сравнительный анализ биологической активности АМП и их комбинаций с антимикробными агентами.

Характеристика биологической активности пептидов. Исследована антимикробная активность пептидов в отношении ряда антибиотикоустойчивых бактерий, в том числе полученных из инфицированных ран. Результаты измерения МИК и дальнейшего расчета ГМИК представлены в Табл. 2. Наиболее активные пептиды – PG-1, PR-39, ChVac3.4 и MC, их ГМИК составил менее 2 мкМ. Хотя PR-39 обладает высокой антимикробной активностью, его действие проявляется в большей степени в отношении грамотрицательных бактерий, что подтверждается и данными литературы по этому пептиду.

Для отбора наиболее безопасных АМП с высокой антимикробной активностью проведена *in vitro* оценка их цитотоксической активности в отношении клеток человека. Результаты оценки гемолитической активности пептидов представлены на Рис. 1, а с

помощью МТТ-теста в отношении ряда других клеток человека – в Табл.3, где также посчитаны индексы селективности (ИС), отражающие соотношение максимальной нетоксичной дозы к минимальной эффективной дозе, обеспечивающей целевой – антимикробный – эффект веществ (ГМИК). В качестве параметра, характеризующего максимальную допустимую токсическую дозу, при расчете $ИС_{T/6}$ использовали эффективную гемолитическую концентрацию $ГК_{30}$, вызывающую гемолиз 30% подвергнутых ее воздействию эритроцитов человека в гемолитическом тесте. При расчете $ИС_{эу/6}$ использовали среднее геометрическое $ИК_{50}$ против нормальных эукариотических клеток (мононуклеаров периферической крови и фибробластов кожи человека).

$$ИС_{2/6} = GK_{30}/GMIK$$

$$ИС_{эу/6} = \sqrt{ИК_{50}^{мононукл.} \cdot ИК_{50}^{фибробл.} / GMIK}$$

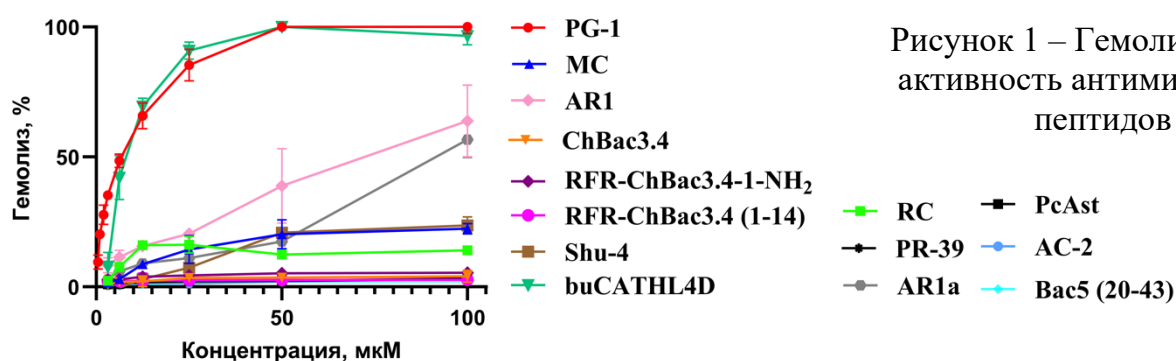


Рисунок 1 – Гемолитическая активность антимикробных пептидов

PG-1 и BuCATHL4 продемонстрировали высокую гемолитическую активность. Ареницин 1 и его аналог также были не лишены токсичности в отношении рассматриваемых клеток.

Наиболее высокие $ИС_{эу/6}$ были получены для пептидов PR-39, PG-1, MC, ChBac3.4, RC, RFR-ChBac3.4(1-14). Последний имеет более слабое антибактериальное действие в сравнении с остальными ($GMIK=5,79$), но практически лишен токсических эффектов для клеток человека и имеет высокий ИС, поэтому также может рассматриваться в качестве перспективного прототипа антимикробных средств. Для PG-1, имеющего наиболее высокую антимикробную активность и один из самых высоких $ИС_{эу/6}$, абсолютное значение концентраций, в которых он начинает проявлять значительную токсичность для клеток человека, тем не менее остается довольно низким, особенно в отношении эритроцитов ($ИС_{T/6}$ уступает по значению другим пептидам). Поэтому желательно попытаться снизить абсолютные показатели токсичности данного пептида, сделав его еще более безопасным. С этой целью была проанализирована возможность снижения нежелательных эффектов при сохранении целевых видов активности путем комбинирования PG-1, как и ряда других АМП с высоким ИС (с целью повышения антимикробной активности), с различными антимикробными агентами – антибиотиками, антисептиками, наночастицами серебра. RFR-ChBac3.4-1-NH₂, несмотря на более низкий ИС, представлял интерес для изучения в составе комбинаций с антибиотиками как один из вариантов модификации ChBac3.4.

Совместная антимикробная активность АМП и других антимикробных агентов. Возможность синергизма АМП с *антибиотиками* широко освещена в литературе. Ранее коллегами отмечалась тенденция к тому, что синергетическое взаимодействие наиболее

Таблица 2 – Минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации АМП

Бактерии	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), мкМ													
	PG-1	PR-39	ChBac 3.4	MC	AR1	buCA THL4	RC	AR1a	RFR-ChBac 3.4-1-NH ₂	RFR-ChBac 3.4(1-14)	Shu4	PcAst	AC-2	Bac5 (20-43)
<i>A. baum.</i> 7226/16	0,5	0,25	0,5	2	1	2	2-4	2	8	8	4-8	>128	>128	32
<i>E. coli</i> ML-35p	0,12–0,25	0,25	1	2–4	2	8	2–4	8	4	1	16–32	>128	>128	>128
<i>P. aer.</i> 522/17 MDR	0,25–0,5	0,25	2	4	4	8	2–4	4	16	16	128	>128	>128	>128
<i>K. pneum</i> ESBL 344/17	0,25	0,12–0,25	4	2	2	4	2	2	4–8	8	128	>128	>128	>128
<i>K. pneum.</i> 1321	0,25	0,5	4	1	4	2	4	8	8	32	64	>128	>128	>128
<i>K. pneum.</i> 5159	0,25	0,125	2	1	1	4	2	2	8	32	2	>128	>128	>128
<i>K. pneum.</i> 5156	0,13	0,5	2	4	2	4	4	2	8	8	64	>128	>128	>128
<i>A. baum</i> 769.2	0,5	0,25	1	1	2	2	4	2	2	8	16	>128	>128	>128
<i>A. baum.</i> 5174	0,06	0,5	0,25	8	1	0,5	4	1	0,25	0,5	2	64	64	>128
<i>A. baum.</i> 5155	0,13	0,25	0,25	1	1	1	2	1	0,5	0,5	2	>128	64	>128
<i>A. baum.</i> 5159	0,13	0,125	0,25	1	1	0,5	2	1	0,25	0,5	32	>128	>128	>128
<i>A. baum.</i> 16.63	0,06	0,25	4	1	8	0,25	2	8	8	32	32	32	>128	>128
<i>S. malt.</i> 414	0,13	8	4	8	8	2	8	8	8	32	64	>128	>128	>128
MRSA ATCC 33591	0,5	32	16	2	2	4	2	4	8	8	64	>128	>128	>128
<i>S. aur</i> 1399/17	0,25	32	2–4	1–2	1	4	2	2	4–8	4	64	>128	>128	>128
ГМИК^a	0,19	0,60	1,52	1,91	2,0	2,09	2,64	2,76	3,48	5,79	22,11	>111,4	>116,7	>116,7

Таблица 3 – Цитотоксическое действие пептидов на клетки человека *in vitro*

ИК ₅₀ ^б – концентрации пептида, при которых наблюдается 50% подавление жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста, мкМ														
Тип клеток	PR-39	PG-1	MC	ChBac 3.4	RC	RFR-ChBac 3.4(1-14)	buCAT HL4D	RFR-ChBac 3.4-1-NH ₂	AR1a	AR1	Shu4	PcAst	Bac5 (20-43)	AC-2
EA.hy926	>100	12,6	25,5	28,6	25	>100	38,3	41	51,9	33,8	19,8	>100	>100	>100
фибробласты	>100	25	>100	>100	>100	>100	41	48	81	25,4	>100	>100	>100	>100
моноклеары	50	3,5	46	19,1	55	>100	11,6	19,4	5,2	3,6	50	>100	>100	>100
ГК₃₀	>100	2,4	>100	>100	>100	>100	5,1	>100	66,5	37,9	>100	>100	>100	>100
ИС_{1/6}	>166,7	12,6	>52,4	>66,0	>37,9	>17,3	2,4	>28,7	24,1	19,0	>4,5	-	-	-
ИС_{3/6}	>117,9	49,3	>35,5	>28,8	>28,1	>17,3	10,4	8,8	7,4	4,8	>3,2	-	-	-

^a ГМИК – геометрическое среднее МИК. ^б ИК₅₀ показан как среднее по трем опытам; для компактности данных отклонения не показаны, они составляли менее 20% от средних.

часто наблюдается в сочетаниях с антибиотиками, действующими на внутриклеточные мишени, в особенности на рибосомальный синтез белка (Zharkova et al., 2019). Это наблюдение в полной мере подтвердилось в экспериментах с АМП МС, RFR ChBac3.4-1-NH₂, где выявлен синергизм их совместного действия с макролидами (эритромицин) и аминогликозидами (амикацин). В комбинациях с РС не было выявлено синергетических эффектов, поэтому в дальнейшем его не изучали. С пептидами ChBac3.4, RFR-ChBac3.4(1-14) и PG-1 были получены аналогичные результаты – частые случаи синергизма помимо амикацина и эритромицина с карбапенемом меропенемом и фторхинолоном офлоксацином (Zharkova et al., 2019; Kopeikin et al., 2020). Важно подчеркнуть, что многократное повышение антимикробной активности наблюдалось даже в случае комбинирования пептидов с антибиотиками (например, эритромицином), к которым бактерии имели низкую чувствительность. Данный факт подтверждает перспективность комбинирования АМП и антибиотиков для преодоления микробной резистентности к последним.

Интерес к взаимодействию АМП с *антисептиками* связан с тем, что они широко применяются для обработки ран. Однако большинство антисептиков проявляют немалую токсичность для клеток макроорганизма, поэтому их применение не всегда желательно в случае долго не заживающих ран или раневых дефектов большой площади. Применение их в составе комбинированного препарата в сниженных концентрациях может способствовать повышению не только эффективности в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов, но и безопасности такого препарата для клеток человека.

При анализе совместного действия антисептиков и АМП PG-1, ChBac3.4, RFR-ChBac3.4(1-14) в отношении карбапенемустойчивых бактерий *Klebsiella spp.* 717 и *A.baumannii* 554 выявлены частые случаи синергизма: 5 случаев для хлоргексидина, 5 – для кокобетаина, 4 – для пронтосана и 2 – для бетадина.

Среди сочетаний АМП (PG-1, ChBac3.4 и PR-39) и *наночастиц серебра* реже всего синергизм наблюдался в комбинации с Ag / OleNa (2 случая), β/Ag^o-5% (5 случаев), Ag / НАЦ 8 (8 случаев), Ag/ НАЦ 10 (9 случаев), чаще всего – с повииарголом (12 случаев). Для сочетаний с Ag / PEG 1500 были выявлены только аддитивные эффекты. Среди АМП несколько чаще синергизм наблюдался в сочетаниях с PR-39 (15 случаев против 11 для PG-1 и 10 для ChBac3.4). Эффекты были определены в отношении бактерий *E.coli* ML-35p, *K. pneumoniae* ESBL 344/17, *P. aeruginosa* 522/17 MDR, *A. baumannii* 7226/16, *S. aureus* 1399/17.

Действие исследуемых препаратов на смешанные культуры микроорганизмов

А) Активность против смешанных культур микроорганизмов, полученных из инфицированных ран. Раневая инфекция часто имеет полиэтиологическую природу, когда причиной заболевания становится несколько видов бактерий. При этом взаимодействие между микроорганизмами усиливает их патогенные свойства и способствует развитию устойчивости к применяемым антимикробным средствам. Для эффективного лечения обычно требуется комбинированная антибиотикотерапия, охватывающая широкий спектр возбудителей и учитывающая особенности их чувствительности. Таким образом, активность против полибактериальных инфекций представляется значимым фактором для оценки при разработке новых препаратов. Поэтому было исследовано совместное действие пептидов с антибиотиками и антисептиками в отношении смешанных культур микроорганизмов, полученных непосредственно в результате посева из раневого отделяемого пациентов с

раневыми инфекциями, не поддававшимся стандартной противомикробной терапии. Определены МИК для антибиотиков, антисептиков и АМП (Табл. 4), а с помощью расчета иФИК определены эффекты их совместного антимикробного действия (Табл. 5).

Таблица 4 – Антимикробная активность пептидов и антимикробных агентов против смешанных культур микроорганизмов, полученных из раневого отделяемого пациентов

Соединение	МИК против бактерий из раневого отделяемого		
	№ 1	№ 2	№ 3
PG-1	0,125 мкМ	>32 мкМ	2 мкМ
ChVac3.4	8 мкМ	>64 мкМ	0,5 мкМ
RFR-ChVac3.4 (1-14)	8 мкМ	>64 мкМ	1 мкМ
А	>125 мкМ	>125 мкМ	7,8 мкМ
Э	125 мкМ	>125 мкМ	125 мкМ
А-Э	>62,5 мкМ	>62,5 мкМ	7,8 мкМ
ПВГ	125 мкг/мл	250 мкг/мл	15,62 мкг/мл
ПРН	4 мкг/мл	8 мкг/мл	0,12 мкг/мл
ХГ	1 мкг/мл	4 мкг/мл	4 мкг/мл
КБН	>50 000 мкг/мл	>50 000 мкг/мл	781 мкг/мл

А – амикацин, Э – эритромицин, ХГ – хлоргексидин, ПВГ – повидон, ПРН – пронтосан, КБН – кокобетаин.

Как видно из Табл. 4 бактерии в составе Культуры 2 устойчивы к пептидам, а также антибиотикам и кокобетаину в исследуемом диапазоне концентраций. Однако, при использовании пептидов в комбинации с антибиотиками, как и с антисептиками, за исключением кокобетаина и пронтосана, наблюдались случаи выраженного синергизма. Наибольшее число случаев синергизма установлено для АМП с комбинацией антибиотиков *амикацином* и *эритромицином*, а также с *хлоргексидином*, поэтому именно они в дальнейшем изучались в составе многокомпонентных комбинаций.

Б) Активность против смешанных культур бактерий (3 вида). Кроме того, была проведена оценка активности исследуемых веществ и их совместного действия против трехкомпонентной культуры антибиотикорезистентных изолятов из инфицированных ран пациентов стационаров (*P. aeruginosa* 522/17 MDR ($0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл) + *S. aureus* 1399/17 ($0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл) + *K. pneumoniae* ESBL 344/17 ($0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл) (Табл. 6 и 7).

Добавление каждого дополнительного компонента, кроме не проявлявшего собственной антимикробной активности фрагмента Vac5(20-43), усиливало эффект комбинации. Возрастание активности при этом очевидно обеспечивается не только наиболее активными составляющими: АМП и хлоргексидином. Малоактивный пептид Vac5(20-43) применяли с учетом его ранозаживляющих свойств, определяющих перспективность использования пептида в качестве компонента ранозаживляющего антимикробного средства – для подтверждения отсутствия антагонизма при его добавлении в состав

Таблица 5 – Совместная антимикробная активность против смешанных культур микроорганизмов, полученных из раневого отделяемого пациентов

Комбинация	Раневое отделяемое	иФИК		
		PG-1	ChVac 3.4	RFR-ChVac 3.4(1-14)
А-Э	№ 1	1,25	0,62	0,5
	№ 2	0,12	0,38	-
	№ 3	0,75	0,75	0,62
ПВГ	№ 1	0,62	0,62	0,19
	№ 2	1,5	0,75	1,5
	№ 3	0,62	0,5	0,62
ПРН	№ 1	0,75	1	0,62
	№ 2	1,5	1	1
	№ 3	0,75	0,75	0,75
ХГ	№ 1	0,31	0,62	0,5
	№ 2	1,5	1,5	1,5
	№ 3	0,5	0,62	0,56
КБН	№ 1	1,5	1,5	1,5
	№ 2	1,5	1,5	1,5
	№ 3	1	0,75	1,5

Жирным выделены случаи синергизма.

многокомпонентной смеси. Установлено, что при внесении Bac5(20-43) антимикробная активность сохраняется на уровне исходных значений практически во всех случаях.

Таблица 6 – Минимальные ингибирующие концентрации исследуемых веществ против смешанной культуры бактерий *P. aeruginosa* 522/17 MDR + *S. aureus* 1399/17 + *K. pneumoniae* ESBL 344/17

АМП, мкМ					Антисептик, мкг/мл	Антибиотики, мкМ		
PG-1	МС	ChBac 3.4	RFR-ChBac3.4 (1-14)	PR-39	Вас5 (20-43)	Хлоргексидин	Амикацин	Эритромицин
0,5-1	4	8	32-64	128	>128	8	>100	>100

Таблица 7 – Наибольшая кратность разведения препаратов антимикробной комбинации, до которой визуально наблюдается полное подавление роста смешанной культуры бактерий *P. aeruginosa* 522/17 MDR + *S. aureus* 1399/17 + *K. pneumoniae* ESBL 344/17

Пептид	Концентрация	Инд. д-ие	Комбинированный препарат								
			+ А-Э 50 мкМ	+ ХГ		+ А-Э 50 мкМ + ХГ		Вас5(20-43) 30 мкМ + А-Э 50 мкМ + ХГ		PR-39 30 мкМ + А-Э 50 мкМ + ХГ	
				50 мкг/мл	100 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл
PG-1	3 мкМ	2-4	16	32	64	64-128	128	128-256	128-256	256-512	1024
	5 мкМ	4-8	32	32	64	64	256	128	128	512-1024	1024
МС	10 мкМ	1-2	2	32	32	64	128	128	128	256	512
	20 мкМ	2-4	32	32	64	128	256	128	256	512	512
RFR-ChBac3.4 (1-14)	30 мкМ	1	64	32	64-128	256	512	256-512	512-1024	-	-
PR-39	30 мкМ	>1	128	64-128	128-256	128	512	-	-	-	-

А - амикацин, Э - эритромицин, ХГ – хлоргексидин.

Влияние исследуемых веществ на проницаемость мембраны бактерий.

Установлено, что новооткрытые пептиды RC и MC, как и PG-1, проявляют мембранолитический характер антимикробного действия. Для ChBac3.4 также наблюдался мембранолитический характер антимикробного действия, но меньшей интенсивности, чем для PG-1, RC и MC, RFR-ChBac3.4(1-14) только частично повреждал внешнюю мембрану бактерии, а PR-39 не оказывал данного эффекта. Их эффекты представлены на Рис. 2, кроме пептида RC, для которого эффект был сходным с MC.

Тем не менее мембранолитический характер действия пептидов не сохранился в многосоставных комбинациях, включающих два АМП – один из упомянутых выше и ранозаживляющий пептид PR-39 или ChBac5(20-43), один антисептик – хлоргексидин, пронтосан или повидаргол, и два антибиотика – амикацин и эритромицин (Рис. 2). Важно отметить, что в данном случае концентрации пептидов в комбинации существенно ниже уровня, при котором ранее описывали мембранолитический эффект пептидов на бактерии, так

как были использованы разведения многосоставных комбинаций, достаточные для проявления антимикробного эффекта. Таким образом, можно предположить, что исследуемые комбинации реализуют механизм антимикробного действия, отличный от мембранолитического.

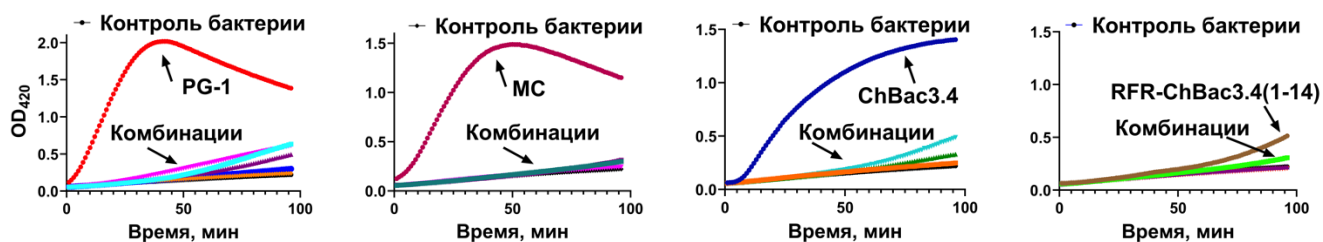


Рисунок 2 – Кинетика изменения проницаемости цитоплазматической мембраны *E.coli* ML-35r для ONPG под действием комбинированных препаратов и пептидов в концентрации 1×МИК

Влияние исследуемых веществ на формирование биопленок бактериями. Условно-патогенные микроорганизмы способны колонизировать кожные раны, образуя биопленки, что затрудняет их уничтожение, главным образом из-за слабого проникновения антибиотиков в биопленку. Определили минимальные эффективные концентрации веществ (Табл. 8).

Таблица 8 – Минимальные эффективные концентрации исследуемых веществ, при которых наблюдается 100% подавление образования биопленки

Бактерия	АМП, мкМ						Антисептики, мкг/мл			
	MC	RC	ChBac 3.4	RFR-ChBac3.4 (1-14)	PG-1	PR-39	ХГ	ПРН	КБН	БТ
<i>P. aer.</i> 522/17 MDR	16	8	8	16	2	0,5	16	4	390,5	6248
<i>A. baum.</i> 7226/16	4	8	2	16	4	1	32	16	3125	1562,5
Бактерия	Наночастицы серебра, мкг/мл									
	Ag / OleNa	Ag / PEG 1500	β /Ag ^o -5%	Ag / НАЦ 8	Ag/ НАЦ10	Повиаргол				
<i>P. aer.</i> 522/17 MDR	3,9	15,6	125	10,12	5,06	31,25				
<i>A. baum.</i> 7226/16	1,95	7,8	62,5	5,06	5,06	31,25				

ХГ – хлоргексидин, ПРН – пронтосан, КБН – кокобетаин, БТ – бетадин.

При исследовании совместного действия АМП с антибиотиками, антисептиками и наночастицами серебра использовали соотношение концентраций, соответствующее синергетическим или соответствующее их МИК, выявленным в тестах на планктонных бактериях. Антибиотики в используемых концентрациях не проявляли собственной активности, поэтому определили во сколько раз они увеличивают активность пептида при совместном действии (Табл. 9). Исключение составил амикацин, проявивший активность против *P. aeruginosa*. Амикацин и офлоксацин только частично подавляли биопленку *A. baumannii*, то есть не были установлены их минимальные эффективные концентрации. В присутствии амикацина наблюдалось более выраженное снижение концентрации пептида, необходимой для полного подавления формирования биопленки *P. aeruginosa*. В случае биопленки *A. baumannii* наибольший эффект оказали исследуемые антибиотики на эффективные концентрации RFR-ChBac3.4(1-14).

Для оценки эффектов совместного действия антисептиков или наночастиц серебра с пептидами рассчитывали комбинационный индекс (КИ) для 100% (ИК₁₀₀) ингибирования биопленки (Табл. 10 и 11) по формуле: $КИ = D_1 / (Dx)_1 + D_2 / (Dx)_2$, где D_1 и D_2 – дозы,

соответствующие ИК₁₀₀ веществ 1 и 2 в составе комбинации; (Dx)₁ и (Dx)₂ – дозы, соответствующие ИК₁₀₀ этих веществ при индивидуальном применении.

Таблица 9 – Изменение активности пептида в присутствии антибиотика в отношении биопленок

Вещество	Потенцирующее действие при ингибировании формирования 100 % биопленки (во сколько раз снизилась действующая концентрация пептида в присутствии антибиотика (или антибиотика в присутствии пептида))									
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 522/17 MDR					<i>Acinetobacter baumannii</i> 7226/16				
	Амика-цин	Эритро-мицин	Меро-пенем	Офлок-сацин	Окса-циллин	Амика-цин	Эритро-мицин	Меро-пенем	Офлок-сацин	Окса-циллин
МС	32 (8)	4	-	-	-	4	1	-	-	-
ChVac 3.4	2 (2)	1	1	1	1	4	1	0,5	2	0,5
PG-1	4 (2)	1	1	2	1	8	1	1	2	1
RFR-ChVac 3.4 (1-14)	8 (4)	2	2	2	-	8	8	4	16	-

Таблица 10 – Сочетанный эффект АМП и антисептиков на биопленки бактерий

Вещество	КИ комбинаций ИК ₁₀₀							
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Acinetobacter baumannii</i>			
	ХГ	ПРН	КБН	БТ	ХГ	ПРН	КБН	БТ
PG-1	0,5	1,25	1,25	0,75	0,62	0,53	0,28	1,12
ChVac3.4	0,5	0,62	1,25	0,37	0,19	0,28	0,15	1,25
МС	0,5	1,25	1,25	0,75	0,5	0,62	0,37	1,5
RFR-ChVac3.4(1-14)	0,75	1,0	1,0	0,75	0,25	0,62	0,09	0,75

Жирным выделены случаи синергизма. ХГ – хлоргексидин, ПРН – пронтосан, КБН – кокобетаин, БТ – бетадин.

Таблица 11 – Сочетанный эффект АМП и наночастиц серебра на биопленки бактерий

Вещество	КИ комбинаций ИК ₁₀₀											
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>						<i>Acinetobacter baumannii</i>					
	Ag/Ole Na	Ag/PEG 1500	Ag/НАЦ 8	Ag/НАЦ 10	Повиа ргол	β/Ag ^o -5%	Ag/Ole Na	Ag/PEG 1500	Ag/НАЦ 8	Ag/НАЦ 10	Повиа ргол	β/Ag ^o -5%
PG-1	0,75	1,5	0,5	0,37	0,62	0,5	-	-	0,53	0,18	0,31	1
ChVac3.4	-	-	0,5	0,5	0,75	0,37	-	-	0,62	0,75	0,5	0,75
PR-39	0,25	0,12	0,5	0,5	0,25	0,5	1	1	1	1	1	1

Жирным выделены случаи синергизма.

Ориентируясь на классификацию, предложенную Чоу (Chou, 2006), близкие к единице значения КИ рассматривали как аддитивность (КИ 0,9–1,1); **синергизм** оценивали как слабый при КИ 0,85–0,9, умеренный при КИ 0,7–0,85, выраженный при КИ 0,3–0,7, сильный при КИ 0,1–0,3, очень сильный при КИ < 0,1; антагонизм полагали слабым при КИ 1,1–1,2, умеренным при КИ 1,2–1,45, выраженным при КИ 1,45–3,3 и сильным при более высоких значениях КИ.

Синергизм противобиопленочного действия был выявлен для сочетаний всех протестированных АМП с антисептиком хлоргексидином, а со всеми наночастицами серебра наблюдались синергетические и аддитивные эффекты, за исключением Ag/PEG1500.

Далее оценили влияние более сложных комбинаций на основе АМП, для которых исследовались эффекты на бактериальные мембраны (Рис. 2). Комбинации, включающие PG-

1 или МС, антибиотики, хлоргексидин и PR-39, продемонстрировали наивысшую активность против биопленок *P. aeruginosa* 522/17 MDR и *A. baumannii* 7226/16. Анализ составов свидетельствует о решающей роли PR-39 в усилении антибиопленочного эффекта. RFR-ChVac3.4(1-14) в комбинации с хлоргексидином, антибиотиками и Vac5(20-43) лишь немного уступал в активности предыдущим комбинациям против биопленки *P. aeruginosa* 522/17 MDR. Также была показана эффективность данных комбинаций на подавление формирования смешанной биопленки *P. aeruginosa* MDR 522/17 и *K. pneumoniae* 4893. Во всех случаях данные комбинации проявляют активность и в субэффективных концентрациях.

Полученные данные о совместных эффектах исследуемых веществ с АМП подчеркивают перспективность использования таких комбинаций в антимикробной терапии.

Совместная цитотоксическая активность веществ. Гемолитическая активность комбинаций, в том числе включающих 5 компонентов – 2 АМП, 2 антибиотика, антисептик – дана в Табл. 12. Часть этих комбинаций была оценена на предмет их влияния на процесс ранозаживления. В целом, в данных комбинациях исследуемые вещества не проявляют значимой гемолитической активности. Исключение составляют комбинации β-шпиличных пептидов с пронтосаном, приведенные как пример, обосновывающий выбор хлоргексидина.

Таблица 12 – Гемолитическая активность многосоставных комбинаций

Комбинация	% гемолиза
Ag / НАЦ 10 + PR-39	1,97±0,85
β/Ag°-5% + PR-39	4,26±0,90
PG-1 + A + Э + ХГ + PR-39	3,55±1,09
PG-1* + A + Э + ПРН* + PR-39*	41,92±2,02
МС + A + Э + ХГ + PR-39**	1,26±0,85
МС* + ПРН** + A	74,9±3,2
RFR-ChVac3.4(1-14) + A + Э + ХГ + Vac5(20-43)	2,84±0,90
RFR-ChVac3.4(1-14)* + A + Э + ПРН + Vac5(20-43)	2,60±2,18

Ag / НАЦ 10 – 10,8 мкг/мл, β/Ag°-5% – 0,5 мг/мл. PR-39 – 30 мкМ, PR-39* – 20 мкМ, PR-39** – 10 мкМ, A – амикацин 50 мкМ, Э – эритромицин 50 мкМ, ХГ – хлоргексидин 50 мкг/мл, ПРН – пронтосан 8 мкг/мл, ПРН* – 16 мкг/мл, ПРН** – 100 мкг/мл, PG-1 – 3 мкМ, PG-1* – 5 мкМ, МС – 10 мкМ, МС* – 20 мкМ, RFR-ChVac3.4(1-14) – 30 мкМ, RFR-ChVac3.4 (1-14)* – 10 мкМ, Vac5(20-43) – 30 мкМ (жирным выделены комбинации, которые применялись для обработки ран мышей).

Изучение эффектов комбинированных препаратов на основе антимикробных пептидов на заживление инфицированных кожных ран у мышей *in vivo*. На модели кожной раны у мышей, инфицированной смешанной культурой клинических изолятов антибиотикоустойчивых бактерий группы ESKAPE, полученных из ран пациентов стационаров (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*) исследованы различные комбинации на основе АМП. Было проведено 19 серий экспериментов. Представлены эксперименты, в которых использованы оптимальные сочетания веществ.

На Рис. 3 показано действие комбинаций АМП PR-39 с наночастицами серебра на гелевой основе ПЭГ600. Установлено, что при использовании данных комбинаций наблюдается ускоренное сокращение площади раневого дефекта по сравнению с контрольной группой (инфицированная рана). Так, при применении PR-39 и его комбинации с β/Ag°-5% удается сократить период полного заживления раны с 18–20 до 12 дней, что сопоставимо с показателями заживления раневого дефекта без инфицирования.

Анализ гистологических препаратов кожи в области раневого дефекта у мышей на 16 сутки после нанесения резаной раны позволил определить степень реэпителизации и ремоделирования кожного покрова у экспериментальных животных (Рис. 4).

На препаратах кожи с инфицированной раной без лечения (контроль 1) отмечено замедление процесса ремоделирования. Эпидермис утолщен в области нанесения раны, его слои не сформированы (Рис 4А), определены скопления лейкоцитов и тонкие коллагеновые волокна (Рис. 4Б), наблюдается диапедез эритроцитов (Рис. 4А). Неинфицированная рана кожи спины мышей (контроль 2) соответствует активной стадии пролиферации и начальному этапу ремоделирования, определена полная эпителизация раны (Рис. 4В). В дерме наблюдается активный процесс формирования коллагеновых волокон: в сосочковом слое видны тонкие волокна, а в сетчатом слое – толстые (Рис. 4Г). Воспалительная инфильтрация минимальна. Таким образом, процесс протекает физиологично, последовательно переходя от эпителизации к стадии активного ремоделирования.

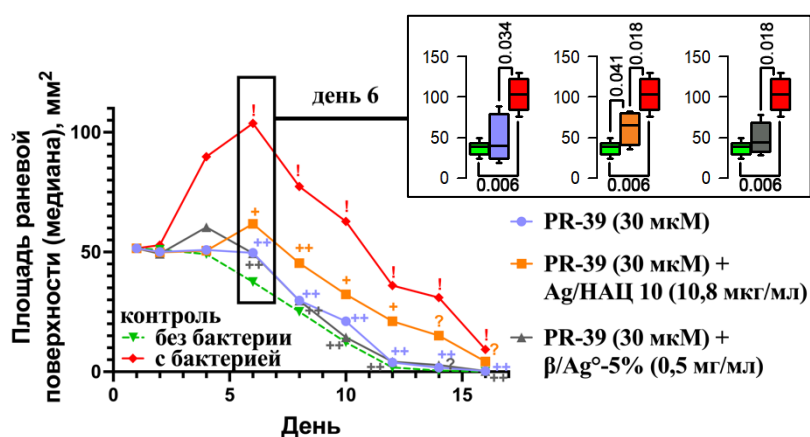


Рисунок 3 – Эффект АМП PR-39 в комбинации с β/Ag° -5% и Ag/НАЦ10 в форме гелей на основе ПЭГ 600 на заживление инфицированной кожной раны у мышей. На вставке проиллюстрировано выявление статистически значимых различий между группами на примере дня 6. Обозначения различий см. Рис.5.

На гистологических срезах кожи, проходящих через центр повреждения на 16-ый день после нанесения ран, в группах, обработанных препаратами PR-39, PR-39 + Ag/НАЦ 10 и PR-39 + β/Ag° -5% отчетливо видно, что эпидермис полностью восстановлен (Рис. 4 Д, Е), различимы все 4 слоя: базальный, шиповатый, зернистый и поверхностный. В группах PR-39 и PR-39 + β/Ag° -5% на границе эпидермиса и дермы, а также и в глубоких слоях дермы определены участки с лейкоцитарной инфильтрацией. В группе PR-39 коллагеногенез находится только в начальной стадии формирования, преобладают тонкие коллагеновые волокна и участки с толстыми неорганизованными волокнами. У экспериментальных животных, рана которых была обработана PR-39 + β/Ag° -5%, можно наблюдать, что в дерме идет активный фиброгенез: коллагеновые волокна синтезируются, но располагаются не упорядочено. На гистологических препаратах определяются участки как с параллельным расположением коллагеновых волокон, так и зоны с их гипертрофическими скоплениями (Рис. 4 Ж), что указывает на нарушение баланса между синтезом и распадом коллагена и может привести к более длительному периоду ремоделирования кожного покрова. В группе PR-39 + Ag/НАЦ 10, в отличие от предыдущих экспериментальных групп, в дерме наблюдается сформированный сосочковый слой, заполненный тонкими коллагеновыми волокнами, и сетчатый слой с толстыми коллагеновыми волокнами (Рис. 4Д). При макроскопическом исследовании животных этот участок кожи был лишен волосяного покрова, однако на гистологических препаратах обнаружены сформированные волосяные луковицы и прорастающие волосы в толще дермы (Рис. 4 Д, Е). Таким образом, PR-39 + Ag/НАЦ 10 способствуют наиболее полноценному ремоделированию кожного покрова, включая формирование гиподермы с восстановлением гладкомышечных волокон и волосяных луковиц по всей площади восстановленной кожи.

Также использовали более сложные комбинации пептидов, антибиотиков и антисептиков. Эффекты данных препаратов на заживление инфицированных ран мышей приведены на Рис. 5, а примеры микрофотографий срезов кожи экспериментальных животных в краевой зоне раневого канала на 10-й день после нанесения ран – на Рис. 4.

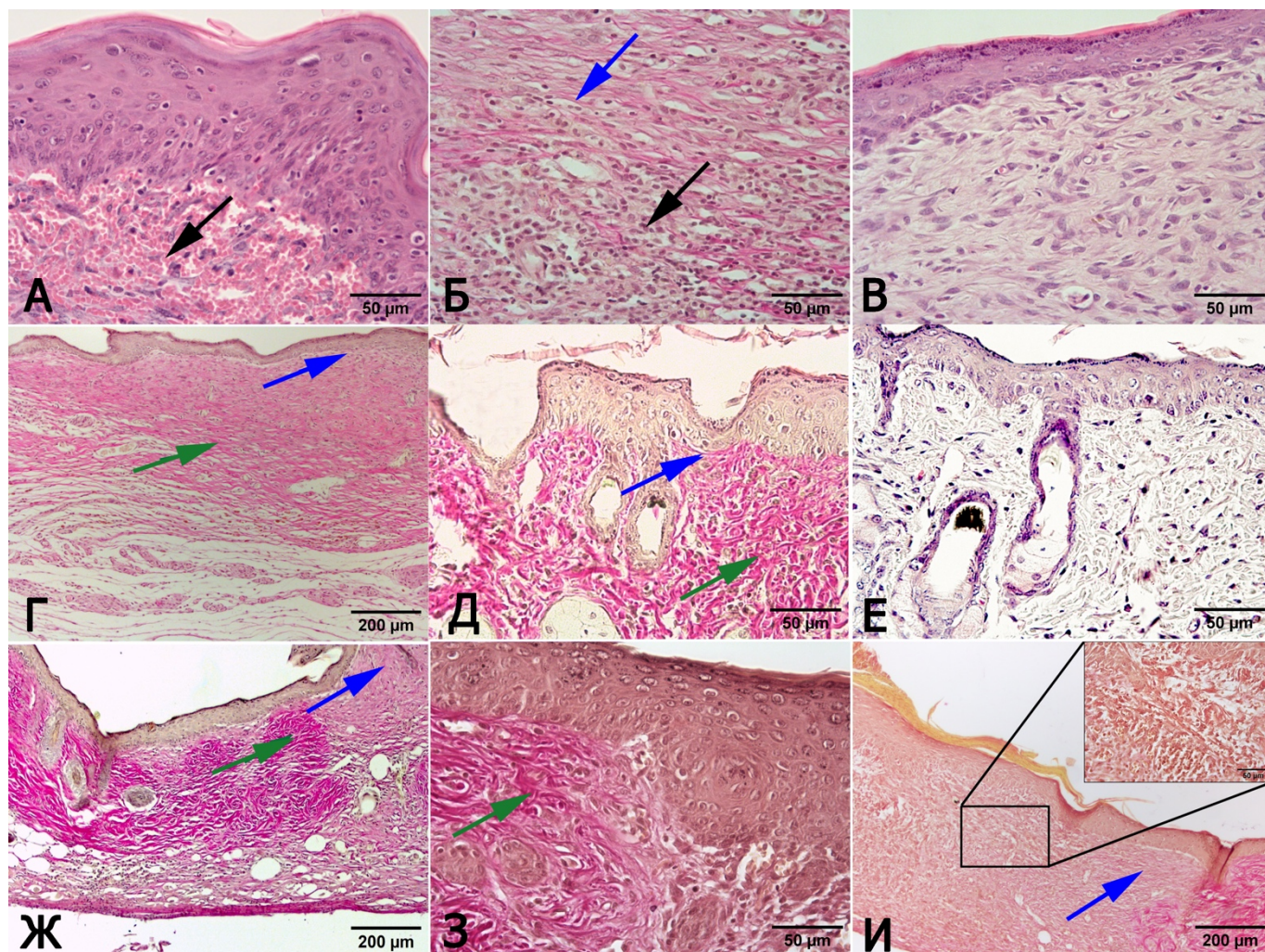


Рисунок 4 – Микрофотографии гистологических срезов кожи экспериментальных животных в зоне нанесения резаной раны через 16 (А–Ж) и 10 (3, И) дней от начала опыта. А,Б: Контроль 1 – инфицированная рана без лечения (обработка гелевой основой без препаратов); В,Г: Контроль 2 – неинфицированная рана (обработка гелем без препаратов); Д,Е: Инфицированная рана, обработанная PR-39 (30 мкМ) + Ag/HAЦ 10 (10,8 мкг/мл); Ж: Инфицированная рана, обработанная PR-39 (30 мкМ) + β /Ag $^\circ$ -5% (0,5 мг/мл); 3: Инфицированная рана, обработанная MS (10 мкМ) + PR-39 (10 мкМ) + А (50 мкМ) + Э (50 мкМ) + ХГ (50 мкг/мл); И: Инфицированная рана, обработанная хлоргексидином – аптечный препарат (0,05 % – 0,5 мг/мл). Черная стрелка показывает на обилие мелких кровеносных сосудов, диапедез клеток крови (А) и лейкоцитарную инфильтрацию (Б); синяя стрелка указывает на тонкие коллагеновые волокна, зеленая стрелка – толстые коллагеновые волокна. Окраска гематоксилин-эозином (А, В, Е). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону (Б, Г, Д, Ж–И).

При обработке ран пептидными препаратами наблюдается нормализация репаративного процесса (Рис. 4 3) по сравнению с контролем 1 (необработанная пептидами инфицированная рана). Так, при использовании препаратов, содержащих RFR-ChVас3.4(1-14), MS или PG-1, продемонстрированы четко различимые слои клеток в эпидермисе, отмечено формирование зернистого и шиповатого слоев эпидермиса по краям раневого канала, в дерме наблюдается обильное формирование коллагеновых волокон (Рис. 4 3). Хотя обработка ран

хлоргексидином (Рис. 4 И) (препарат сравнения) и приводит к уменьшению площади раневой поверхности, гистологическая картина несколько отличается от наблюдаемой при обработке пептидными препаратами: эпителизация по краю струпа проходит медленнее – нет сформированных слоев эпидермиса. На Рис. 4 И продемонстрировано замедленное восстановление глубоких слоев кожи: наблюдается отек и элементы воспаления соединительной ткани (увеличенный фрагмент Рис. 4 И), отсутствие образования коллагеновых волокон.

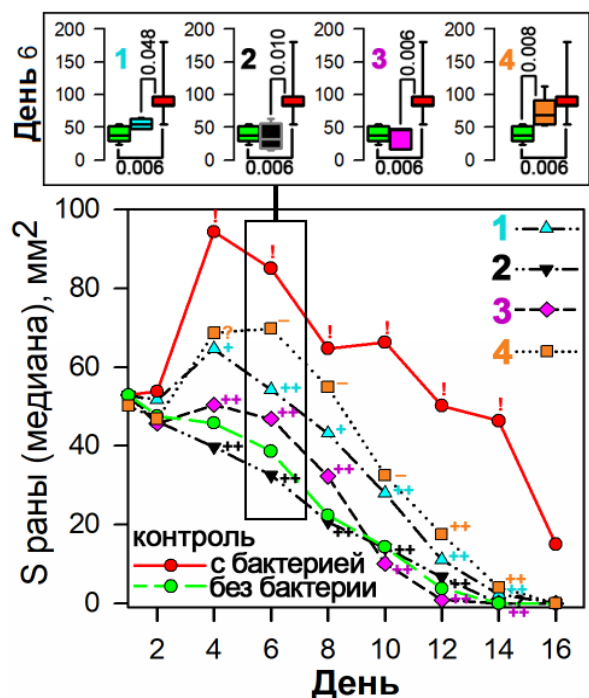


Рисунок 5 – Эффекты комбинированных препаратов АМП, а также хлоргексидина в форме гелей на основе ГК + OrnRK на заживление инфицированной кожной раны у мышей. Группы:

1. МС (10 мкМ) + PR-39 (10 мкМ) + А (50 мкМ) + Э (50 мкМ) + ХГ (50 мкг/мл)

2. RFR-ChBac3.4(1-14) (30 мкМ) + Bac5(20-43) (30 мкМ) + А (50 мкМ) + Э (50 мкМ) + ХГ (50 мкг/мл)

3. PG-1 (3 мкМ) + PR-39 (30 мкМ) + А (50 мкМ) + Э (50 мкМ) + ХГ (50 мкг/мл)

4. ХГ – аптечный препарат (0,05 % – 0,5 мг/мл)

Статистически значимые различия: «!» – между инфицированным и неинфицированным контролем; «+» – экспериментальной группы с обоими контролями; «++» – с инфицированным контролем, при этом без отличия от неинфицированного; «->» – с неинфицированным контролем, при этом без отличий от инфицированного; «?» – без различий с обоими контролями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено исследование, способствующее решению научных задач патофизиологии, связанных с созданием новых подходов в лечении болезней, в первую очередь инфекционных заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями группы ESKAPE, в том числе формирующими биопленки.

В ходе исследования отобраны синтетические аналоги пептидов врожденного иммунитета, обладающие наиболее высоким индексом селективности (для бактериальных клеток по сравнению с клетками человека) – PR-39, PG-1, МС, ChBac3.4, RC, RFR-ChBac3.4(1-14), получены комбинированные препараты, в которых активность АМП многократно повысилась вследствие сочетания с такими антимикробными агентами как антибиотики, антисептики и наночастицы серебра, показана антибиопленочная активность исследуемых препаратов, подтверждена их эффективность в экспериментах на животных на модели заживления инфицированных ран. Наиболее эффективные препараты: PR-39 с Ag/НАЦ10, а также многокомпонентные комбинации с антибиотиками эритромицином и амикацином, антисептиком хлоргексидином и пептидами RFR-ChBac3.4(1-14) и Bac5(20-43); МС и PR-39; PG-1 и PR-39.

В работе доказано, что пептиды осуществляют непосредственное воздействие на микроорганизмы, приводящее к элиминации патогенов, что говорит о возможности использования этих препаратов в этиотропной терапии инфекций. Хотя результаты

исследования показывают положительный эффект антимикробных композиций на репаративный процесс, на основании полученных данных нельзя сделать однозначное заключение о воздействии пептидов на регенерацию тканей – возможно, динамика раневого процесса изменяется за счет эффективного удаления микроорганизмов. Дальнейшее изучение механизмов действия исследуемых препаратов на раневой процесс позволит сделать более определенный вывод о возможности применения их не только как средств этиотропной, но и патогенетической терапии раневых инфекций.

В целом, в результате проведенного исследования получена информация, важная для установления новых путей создания эффективных лекарственных средств на основе антимикробных пептидов животного происхождения и обоснования возможности усиления их активности в комбинированных препаратах для применения в терапии раневых инфекций.

Практические рекомендации. Разработанные антимикробные композиции могут быть использованы в качестве препаратов для местного применения в случаях, когда стандартная схема терапии оказывается неуспешной – при иммуносупрессии различной этиологии, раневых дефектах большой площади, долго не заживающих ранах, осложненных раневых процессах.

ВЫВОДЫ

1. Большинство исследуемых синтетических антимикробных пептидов, чистота которых составляла не менее 94 %, обладают выраженной антимикробной активностью против мультирезистентных штаммов бактерий, оцененной как среднее геометрическое минимальных ингибирующих концентраций (ГМИК). Наиболее активные пептиды – протегрин-1 (ГМИК=0,19 мкМ), PR-39 (ГМИК=0,60 мкМ) и ChVac3.4 (ГМИК=1,52 мкМ), модификации последнего несколько менее эффективны (ГМИК=3,48 и 5,79 мкМ). Для пептидов RC и MC, buCATHL4D и ареницинов ГМИК находится в диапазоне 1,91–2,76 мкМ; пептида шучина-4 – 22,11 мкМ, а пептиды астацидины не проявили активность против исследуемых штаммов.

2. Структурный аналог бактенецина RFR-ChVac3.4(1-14), а также пептиды PR-39, MC и RC, обладают низкой цитотоксической активностью в отношении нормальных клеток человека. Несмотря на то, что пептид PG-1 демонстрировал относительно высокие показатели цитотоксического действия в отношении мононуклеаров и нормальных фибробластов человека, для него показан один из самых высоких индексов селективности (ИС) – 49,3 (учитывающий соотношение цитотоксической и противомикробной активности и позволяющий судить о перспективах практического применения соединений). Высокие ИС_{эу/б} показали также PR-39, MC, RC, ChVac3.4 и RFR-ChVac3.4(1-14) (117,9; >35,5, >28,1, >28,8 и >17,3 соответственно). Более низкие: buCATHL4D, ареницины и модификация бактенецина RFR-ChVac3.4-1-NH₂ (10,4, 4,8–7,4, 8,8, соответственно). В соответствии с полученными ИС наиболее перспективными для дальнейшего исследования оказались пептиды PR-39, PG-1, MC, RC, ChVac3.4 и RFR-ChVac3.4(1-14).

3. Наиболее частые случаи синергизма против исследуемых бактерий выявлены для комбинаций PG-1, ChVac3.4 и PR-39 с β/Ag^o-5%, Ag/НАЦ 8, Ag/НАЦ 10 и повииарголом; PG-1, MC, ChVac3.4 и RFR-ChVac3.4-1-NH₂ с эритромицином и амикацином, а для RFR-

ChVac3.4(1- 14) с эритромицином, амикацином и офлоксацином; PG-1, ChVac3.4 и RFR-ChVac3.4(1-14) с хлоргексидином. При составлении композиций из нескольких компонентов – АМП, антибиотики, антисептик – эффективность препаратов многократно повышается. Комбинированные препараты на основе АМП осуществляют антимикробное действие без существенного влияния на проницаемость цитоплазматической мембраны *E.coli* ML-35p для хромогенного маркера, что исключает мембранолитический механизм их антибактериальных эффектов.

4. Исследуемые пептиды и многосоставные комбинации на их основе проявляют антибиопленочную активность и в субэффективных концентрациях препятствуют формированию бактериальных биопленок антибиотикоустойчивыми бактериями (*P. aeruginosa* MDR 522/17 и смешанная биопленка *P. aeruginosa* MDR 522/17 + *K. pneumoniae* 4893, в меньшей степени *A. baumannii* 7226/16). Комбинирование АМП с наночастицами серебра, антибиотиками и антисептиками приводит к повышению эффективности подавления формирования биопленки. Более частые случаи синергизма противобиопленочного действия выявлены для MC, RFR-ChVac3.4(1-14), PG-1, ChVac3.4 с хлоргексидином, а также пептидов PG-1, ChVac3.4 и PR-39 с наночастицами серебра β/Ag° -5%, Ag/НАЦ 8, Ag/НАЦ 10 и повиярголом в отношении биопленки *P. aeruginosa* MDR 522/17. Среди многосоставных комбинаций наиболее выраженный эффект показали комбинации антибиотиков и хлоргексидина с пептидами PG-1 и PR-39, MC и PR-39, RFR-ChVac3.4(1-14) и ChVac5(20-43). В большинстве случаев в многокомпонентных комбинациях антимикробных пептидов с антибиотиками и антисептиками не наблюдается повышения гемолитической активности, она сохраняется на низком уровне (<6%), кроме комбинации β -шипилечных пептидов с пронтосаном, где происходит усиление повреждающего эффекта на эритроциты.

5. Установлено стимулирующее действие комбинаций на основе пептидов на динамику заживления инфицированных кожных ран у мышей. Наиболее эффективные комбинации, при использовании которых наблюдается ускорение сокращения площади раневого дефекта, более эффективное очищение инфицированной раны и более полноценное восстановление ткани – PR-39 с Ag/НАЦ 10, а также комбинации антибиотиков амикацина с эритромицином и хлоргексидина с RFR-ChVac3.4(1-14) и Vac5(20-43), MC и PR-39, PG-1 и PR-39.

6. В результате проведенных исследований созданы прототипы комбинированных лекарственных препаратов, которые обладают активностью в отношении антибиотикорезистентных штаммов, стимулируя заживление инфицированных ран. Показанные эффекты свидетельствуют о перспективности продвижения данных соединений в медицину в качестве препаратов для применения в терапии раневых инфекций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, и/или в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных Scopus/Web of Science:

1. **Владимирова Е.В.** Эффективные комбинации наночастиц серебра и антимикробных пептидов против антибиотикорезистентных бактерий // Медицинский академический журнал. – 2024. – Т. 24, № 2. – С. 53-56. – DOI 10.17816/MAJ630076. [ВАК; БС; Scopus]

2. **Владимирова Е.В.**, Шамова О.В. Применение наночастиц серебра в медицине: плюсы и минусы. Преимущества композитов наночастиц серебра с органическими антибактериальными субстанциями и биосовместимыми полимерами // Медицинский академический журнал. – 2025. – Т. 25. – №3. – С. 5–21. doi: 10.17816/MAJ635890. [BAK; BC; Scopus]

3. **Владимирова Е.В.** и др. Совместное действие катионных пептидов протегринов и антисептиков на биопленки, сформированные грамположительными и грамотрицательными бактериями // Акушерство и гинекология. – 2025. – № 5. – С. 158-168. – DOI: 10.18565/aig.2025.120. [BAK; BC; Scopus]

4. **Владимирова Е.В.** и др. Эффективность комбинированных препаратов антимикробных пептидов в отношении антибиотикорезистентных бактерий // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2026. – Т. 24. – №1. – С. 93–109. – DOI: 10.17816/RCF695956. [BAK; BC; Scopus]

5. Zharkova M.S., Golubeva O.Y., Orlov D.S., **Vladimirova E.V.** et al. Silver Nanoparticles Functionalized With Antimicrobial Polypeptides: Benefits and Possible Pitfalls of a Novel Anti-infective Tool // Frontiers in microbiology. – 2021. – V. 12. – 750556. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.750556. [Scopus; WOS]

6. Vishnevetskii D.V., Averkin D.V., Efimov A.A., Lizunova A.A., Shamova O.V., **Vladimirova E.V.** et al. l-Cysteine and N-acetyl-l-cysteine-mediated synthesis of nanosilver-based sols and hydrogels with antibacterial and antibiofilm properties // Journal of Materials Chemistry B. – 2023. – V. 11. – №. 25. – P. 5794-5804. – DOI: 10.1039/d3tb00261f. [BC; Scopus; WOS]

7. Zharkova M.S., Komlev A.S., Filatenkova T.A., Sukhareva M.S., **Vladimirova E.V.** et al. Combined Use of Antimicrobial Peptides with Antiseptics against Multidrug-Resistant Bacteria: Pros and Cons // Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. – №. 1. – 291. – DOI: 10.3390/pharmaceutics15010291. [BC; Scopus; WOS]

8. Smetanin R.V., Sukhareva M.S., **Vladimirova E.V.** et al. First vertebrate BRICHOS antimicrobial peptides: β -hairpin host defense peptides in limbless amphibia lung resemble those of marine worms // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 712–713. – 149913. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.149913. [BC; Scopus; WOS]

9. Golubeva O.Y., Ulyanova N.Y., **Vladimirova E.V.**, Shamova O.V. Comparison of the antimicrobial and hemolytic activities of various forms of silver (ions, nanoparticles, bioconjugates) stabilized in a zeolite matrix // Langmuir. – 2021. – V. 37. – №. 42. – P. 12356–12364. – DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c01899. [Scopus; WOS]

Статьи в иных изданиях:

10. Шамова О.В., Жаркова М.С., Чернов А.Н., **Владимирова Е.В.** и др. Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями // Российский журнал персонализированной медицины. – 2021. –Т. 1, №1. –С. 146–172. [РИНЦ]

Тезисы докладов:

1. **Владимирова Е.В.** и др. Анализ антимикробной и гемолитической активности препаратов, содержащих ионное серебро или наночастицы серебра // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3(30). – С. 398-401.

2. **Владимирова Е.В.** и др. Антимикробные свойства и токсичность препаратов, содержащих серебро // Материалы научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ». – 18–23 ноября 2019, г. Санкт-Петербург. – В 2 ч. Ч. 1. – С. 124-127.

3. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С. Синергетические эффекты антимикробного действия протегрина-1 и наночастиц серебра // Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021». – 25–26 марта 2021, г. Санкт-Петербург. – С. 30-31.

4. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С. Анализ биологической активности комбинаций протегрина-1 и наночастиц серебра // Материалы XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». – 24 апреля 2021, г. Санкт-Петербург. – С. 591-592.

5. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С. Ранозаживляющие эффекты антимикробного пептида Vas 5 (20-43) и его комбинации с наночастицами серебра // *Материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье»*. – 16.04.2022, г. Санкт-Петербург. – С. 272-273.
6. Петрова П.Е., Комлев А.С., Сухарева М.С., **Владимирова Е.В.** Получение синтетического аналога антимикробного пептида Shuchin-4 и его действие на резистентные штаммы бактерий // *Сборник тезисов IX Международного Молодежного Медицинского Конгресса*. – 07–09 декабря 2022, г. Санкт-Петербург. – С. 224-225
7. **Владимирова Е.В.** и др. Эффективность наночастиц серебра, стабилизированных соединениями различной природы, а также их комбинаций с пептидом протегрином-1 против антибиотикоустойчивых бактерий // *Сборник тезисов IX Международного Молодежного Медицинского Конгресса*. – 07–09 декабря 2022, г. Санкт-Петербург. – С. 216-217
8. **Владимирова Е.В.** Эффекты сочетанного действия антимикробного пептида бактенецина в комбинации с различными антибиотиками против бактериальных биопленок // *Материалы XXIX Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023»*. – 30–31 марта 2023, г. Санкт-Петербург. – С. 49-51.
9. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С. Анализ антимикробной активности наночастиц серебра против антибиотикоустойчивых бактерий // *Материалы XXVI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье»*. – 22 апреля 2023, г. Санкт-Петербург. – С. 232-233.
10. **Владимирова Е.В.** и др. Эффективность синтетических аналогов природных антимикробных пептидов RC и MC в комбинации с антибиотиками в отношении антибиотикоустойчивого штамма бактерии *Acinetobacter Baumannii* // *Сборник тезисов LXXXIV научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2023»*. – 01–27.04.2023, г. Санкт-Петербург. – С. 228-229.
11. **Vladimirova E.V.** et al. Comparative analysis of antimicrobial activity of various silver nanoparticles and their combined action with β -hairpin peptides // *III International Mini-Conference “Antimicrobial peptides as prototypes of novel antibiotics”*. – 19–20.07.2023, Saint-Petersburg. – P. 32-22.
12. **Владимирова Е.В.** и др. Сравнительный анализ антимикробной активности различных наночастиц серебра и их совместное действие с β -шпилечными пептидами // *Материалы всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям»*. – 22–25 сентября 2023, Новосибирск. – С. 135-136.
13. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С. Разработка состава инновационного ранозаживляющего комбинированного препарата на основе наночастиц серебра и антимикробных пептидов // *Сборник проектов конкурса "Всероссийская научная школа "Медицина молодая": III научно-образовательный форум*. – 07 декабря 2023, г. Москва. – С. 1314-1316.
14. Голубева О.Ю., Бразовская Е.Ю., Ульянова Н.Ю., Аликина Ю.А., **Владимирова Е.В.**, Шамова О.В. Использование цеолитов в медицине: проблемы и перспективы // *Сборник тезисов докладов Третьего международного симпозиума «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства»*. – 05–07 июня 2024, г. Санкт-Петербург. – С. 49-51.
15. Шамова О.В., Жаркова М.С., Комлев А.А., **Владимирова Е.В.** и др. Патофизиологические основы разработки новых антимикробных средств на основе пептидов системы врожденного иммунитета // *Клиническая патофизиология – 2024*. – Т. 30. – №. S2. – С. 135-136.
16. **Владимирова Е.В.** Разработка нового способа коррекции инфекционной патологии, вызываемой антибиотикорезистентными бактериями, с использованием комбинаций антимикробных пептидов, антибиотиков и наноматериалов // *Сборник тезисов докладов участников IX Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего — наука молодых»* — 29 октября – 01 ноября 2024 года, г. Самара. – С. 182.
17. **Vladimirova E.V.**, Shamova O.V. Development of new approaches for correction of infectious pathology caused by antibiotic-resistant bacteria using combinations of natural peptides, antibiotics and nanomaterials // *Book of Abstracts IV of Mini-Conference with International Participation «Antimicrobial Peptides as Prototypes of Novel Antibiotics»*. – 18–19.07.2024, St. Petersburg. – P. 70-71.

18. Shamova O.V., Zharkova M.S., **Vladimirova E.V.** et al. Creation of new antibiotics based on natural antimicrobial peptides of the family of cathelicidins: the first steps towards introduction into medicine // Book of Abstracts IV of Mini-Conference with International Participation «Antimicrobial Peptides as Prototypes of Novel Antibiotics». – 18–19.07.2024, St. Petersburg. – P. 13-15.

19. Шамова О.В., Елисеев И.Е., **Владимирова Е.В.** и др. Создание новых прототипов лекарственных средств для применения в терапии раневых инфекций на основе антимикробных пептидов животного происхождения и их структурных модификаций // Сборник тезисов докладов VI Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2024», XI Российского симпозиума «Белки и пептиды» и Российско-китайского конгресса в области наук о жизни. – 29.10–02.11.2024, г. Москва. – С. 365.

20. **Владимирова Е.В.**, Сухарева М.С., Шамова О.В. Разработка новых лекарственных средств на основе антимикробных пептидов и их комбинаций с антимикробными агентами // Сборник трудов VI Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности». – 3–5 сентября 2025, г. Санкт-Петербург. – С. 81–83.

21. **Владимирова Е.В.** и др. Исследование новых средств коррекции нарушений при инфекциях, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями // Сборник тезисов докладов Всероссийской научно-практической конференции "Экспериментальная медицина", посвященной 135-летию Института экспериментальной медицины. – 16–17.10.2025, г. Санкт-Петербург. – С. 162.

Патенты на изобретения:

1. Шамова О.В., Жаркова М.С., Орлов Д.С., Комлев А.С., **Владимирова Е.В.** и др. Пептид, обладающий антибактериальной активностью в отношении микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью. Патент на изобретение № 2771493 С1, 05.05.2022.

2. Елисеев И.Е., Сметанин Р.В., Шамова О.В., Климов Н.А., Комлев А.С., Сухарева М.С., **Владимирова Е.В.** и др. Синтетические аналоги природных пептидов, обладающих антибактериальной активностью. Патент на изобретение № 2826459 С1, 11.09.2024.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А – амикацин; АМП – антимикробные пептиды; БТ – бетадин; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ГК + OrnRK – гиалуроновая кислота, содержащая орнитин, аргинин, лизин; ГК₃₀ – концентрация, вызывающая 30%-ый гемолиз; ЗФР – забуференный физиологический раствор; ИК_i – ингибирующие концентрации вещества, при которых наблюдается *i* процентов эффекта; ИС – индекс селективности; ИС_{г/б} – индекс селективности в отношении эритроцитов человека; ИС_{эу/б} – индекс селективности в отношении нормальных эукариотических клеток (моноклеаров и фибробластов); иФИК – индекс фракционной ингибирующей концентрации; КБН – кокобетаин; КИ – комбинационный индекс; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ПВГ – повиаргол; ПРН – пронтосан; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ХГ – хлоргексидин; Э – эритромицин; ГМИК – среднее геометрическое минимальных ингибирующих концентраций; OD – оптическая плотность; ONPG – *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид; MRSA – methicillin-resistant (штамм устойчивый к метициллину) *Staphylococcus aureus*.