

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ КАТИОННЫХ ПЕПТИДОВ И ФУЛЛЕРЕНА

А. А. Галкина¹✉, Д. К. Болякина¹, А. В. Шатилова¹, А. А. Шатилов¹, М. О. Бабихина¹, А. К. Голомидова², С. М. Андреев¹, Н. Н. Шершакова¹, М. Р. Хаитов^{1,3}

¹ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Инфекции кожи и мягких тканей при хирургических манипуляциях обычно вызваны широким спектром бактериальных микроорганизмов, и служат основной причиной септических осложнений и госпитальной смертности. Лечение таких ран является очень сложной проблемой, часто обусловленной переходом воспалительного процесса в хроническую стадию в связи с наличием устойчивой патогенной микрофлоры в раневой ткани. Целью работы было проанализировать ранозаживляющую активность мазевой композиции на основе водной дисперсии фуллера C60 (ВДФ) на модели кожной травмы *in vivo*, оценить влияние ВДФ на экспрессию цитокинов как маркеров регенеративных процессов, определить антибактериальную активность разработанных нами катионных пептидов. ВДФ получали методом тангенциальной ультрафильтрации, а затем на ее основе готовили мазевую композицию. Моделирование кожной травмы проводили с использованием мышей линии BALB/c. Синтез катионных пептидов (КП) осуществляли твердофазным методом, используя Fmoc-технология. Антибактериальную активность КП и ВДФ оценивали методом подсчета колоний. Установлено, что мазь на основе ВДФ обладала ранозаживляющей и противовоспалительной активностью. У наиболее активных КП, АВ-1, АВ-2, АВ-3 и ST-10 минимальная бактерицидная концентрация (МБК) в отношении бактериального штамма *E. coli* Dh5α составляла 1,15, 0,11, 0,74 и 0,74 мМ, соответственно, при МБК ампициллина 0,7 мМ. Мы предполагаем, что создание гибридных соединений/конъюгатов фуллера C60 с активными КП будет перспективным направлением в разработке лекарственных средств для терапии раневых поражений, осложненных бактериальной инфекцией.

Ключевые слова: водный раствор фуллера C60, ранозаживляющая активность, катионные пептиды, антибактериальная активность

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания ФМБА «Фуллерен-21» (код 612.017.1:616.9).

Вклад авторов: А. А. Галкина — постановка методики, лабораторные исследования, написание статьи; Д. К. Болякина — лабораторные исследования; А. В. Шатилова, А. А. Шатилов, М. О. Бабихина — лабораторные исследования; А. К. Голомидова — постановка методики; Н. Н. Шершакова — постановка методики, концепция исследования, написание статьи, научное руководство; С. М. Андреев — постановка методики, концепция исследования, научное руководство; М. Р. Хаитов — концепция исследования, научное руководство.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комиссией по биоэтике Института иммунологии ФМБА России (приказ № 102 ноябрь 2015 г.), проведено в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС для экспериментов на животных и Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России.

✉ Для корреспонденции: Анастасия Андреевна Галкина
Каширское ш., д. 24, г. Москва, 115522, Россия; anastasia.a.galkina@gmail.com

Статья получена: 28.07.2023 Статья принята к печати: 05.09.2023 Опубликовано онлайн: 29.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.036

DEVELOPING AND EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF WOUND-HEALING COMPOUNDS BASED ON CATIONIC PEPTIDES AND FULLERENE

Galkina AA¹✉, Bolyakina DK¹, Shatilova AV¹, Shatilov AA¹, Babikhina MO¹, Golomidova AK², Andreev SM¹, Shershakova NN¹, Khaitov MR^{1,3}

¹ National Research Center — Institute of Immunology of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Skin and soft tissue infections following surgical procedures are usually caused by a broad range of bacteria and are the major cause of septic complications and hospital mortality. Treatment of such wounds is a challenge often resulting from the transition from acute to chronic inflammation due to persistence of pathogenic microflora in the wound tissue. The study was aimed to assess the wound-healing activity of the ointment composition based on the dispersion of fullerene C60 (AFD) in the *in vivo* model of skin wound, to estimate the effects of AFD on the expression of cytokines as markers of regenerative processes, to determine antibacterial activity of the developed cationic peptides. AFD was obtained by tangential ultrafiltration and used to make an ointment composition. The BALB/c mice were used to model the skin injury. The cationic peptides (CPs) were synthesized by the solid-phase method using the Fmoc technology. Antibacterial effects of CPs and AFD were estimated by colony counting. It was found that the AFD-based ointment exerted wound-healing and anti-inflammatory activity. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of the CPs most active against the *E. coli* Dh5α strain, AB-1, AB-2, AB-3, and ST-10, were 1.15, 0.11, 0.74, and 0.74 mM, respectively, while MBC of ampicillin was 0.7 mM. We assume that constructing the hybrid compounds/fullerene C60 conjugates with active CPs will be a promising area of the development of drugs for treatment of wounds complicated by bacterial infection.

Keywords: fullerene C60 aqua dispersion, regenerative activity, cationic peptides, antibacterial activity

Funding: the study was conducted as part of the State Assignment of FMBA "Fullerene-21" (code 612.017.1:616.9).

Author contribution: Galkina AA — setting up methodology, laboratory tests, manuscript writing; Bolyakina DK — laboratory tests; Shatilova AV, Shatilov AA, Babikhina MO — laboratory tests; Golomidova AK — setting up methodology; Shershakova NN — setting up methodology, study concept, manuscript writing, research supervision; Andreev SM — setting up methodology, study concept, research supervision; Khaitov MR — study concept, research supervision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Bioethics Commission of the Institute of Immunology of FMBA of Russia (order № 102 of November 2015) and conducted in accordance with the Directive 2010/63/EU for animal experiments and the Regulations Regarding Research Involving Laboratory Animals in the National Research Center — Institute of Immunology of FMBA of Russia.

✉ Correspondence should be addressed: Anastasia A. Galkina
Kashirskoe sh., 24, Moscow, 115522, Russia; anastasia.a.galkina@gmail.com

Received: 28.07.2023 Accepted: 05.09.2023 Published online: 29.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.036

Заживление кожных ран представляет собой сложный процесс, в котором задействованы различные типы клеток и множество регуляторных факторов, а сбой в нормальном процессе заживления может приводить к образованию рубцов и перехода воспаления в хронический процесс. Рубцы могут ограничивать движение, вызывать боль, зуд, а также быть причиной физиологического стресса в том случае, когда рубцы на коже остаются видимыми и не могут быть скрыты одеждой или косметикой, что серьезно влияет на самооценку и качество жизни человека. Удаление и коррекция шрамов и рубцов остаются актуальной проблемой, поскольку, несмотря на разнообразие доступных методов лечения, их эффективность весьма ограничена. Объем мирового рынка в данной сфере в 2019 г. составил 19,6 млрд долларов, и ожидается, что в следующем десятилетии он вырастет на 11,5% [1].

Эффективному лечению осложнений раневого процесса могут препятствовать сопутствующие заболевания, такие как сахарный диабет, гипертоническая болезнь, а также другие сосудистые и аутоиммунные заболевания [2]. Важную роль в хронизации воспаления играют бактериальные суперинфекции.

Все раны в той или иной степени контаминированы микроорганизмами, входящими в состав сапрофитной микрофлоры кожи. Вид и количество этих микроорганизмов варьируют в зависимости от типа раны [3]. Самыми распространенными видами бактерий, вызывающими раневые инфекции, являются *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Acinetobacter baumannii* [4]. Известно, что раневые инфекции составляют треть случаев нозокомиальных инфекций среди хирургических больных и являются причиной 70–80% смертельных случаев при раневых поражениях [5]. Хронические раны влияют на качество жизни пациентов наряду с повышенной заболеваемостью и смертностью и являются огромным финансовым бременем для систем здравоохранения во всем мире, поскольку связаны с затратами на длительную госпитализацию, диагностические тесты, антибиотики и, иногда, инвазивную хирургию [6, 7]. Поэтому заживление ран представляет собой серьезную медицинскую проблему и требует разработки безопасных и эффективных лечебных средств.

Основу доступных препаратов для заживления ран составляют адсорбенты, противовоспалительные компоненты, антибиотики или декспантенол, стимулирующие процессы регенерации. В связи с тревожным ростом резистентности к классическим противомикробным препаратам, актуальной задачей становится поиск новых подходов к лечению ран, осложненных бактериальной инфекцией. Среди альтернативных противомикробных агентов особое внимание уделяется катионным антимикробным пептидам (КАМП) [8].

Катионные пептиды (КП) как транспортеры и как биологически активные субстанции привлекают огромное внимание ввиду их высокого сродства к клеточным мембранам, наличия определенной структуры с возможностью анализа масс-спектрометрией и широкими возможностями для разнообразного дизайна таких молекул. КП широко распространены в природе, они присутствуют у всех млекопитающих, особенно в коже, где играют защитную роль против патогенных микроорганизмов. Катионные антимикробные пептиды, или пептиды защиты хозяина (host defense peptides), представляют собой гетерогенную группу коротких положительно заряженных

пептидов преимущественно амфифильной природы, секретируемых иммунными (например, нейтрофилами и макрофагами [9]) и эпителиальными клетками позвоночных и беспозвоночных для защиты от микробных инвазий [10]. К недостаткам применения пептидов в качестве потенциальных противомикробных препаратов для терапии относят очень сложную для синтеза структуру, а также протеолитическую неустойчивость КП. Предполагается, что конъюгирование КАМП с иными биологически активными молекулами, такими как другие пептиды, полипептиды, белки и, в целом, антибиотики может способствовать улучшению противомикробных свойств, а также лежать в основе создания препаратов с мультибиологической активностью. В частности, создание малотоксичных эффективных препаратов, сочетающих антибактериальную и противовоспалительную активности, с низкой вероятностью развития резистентности, внесло бы существенный вклад как в фундаментальную науку, так и в практическое здравоохранение.

Поскольку КАМП протеолитически неустойчивы, в качестве несущей платформы для пептидов представляется перспективным, на наш взгляд, использование такой молекулы, как фуллерен C60.

Фуллерен C60 представляет собой молекулярное образование углерода в форме усеченного икосаэдра, обладающее сильной антиоксидантной активностью. Известно, что водорастворимые формы фуллерена C60 проявляют множественные биологические эффекты, включая противовирусные, противовоспалительные, противоаллергические и регенеративные свойства [11, 12]. При моделировании раневого процесса *in vivo* было показано, что некоторые ковалентные производные фуллерена C60 ускоряют заживление ран и предотвращают инфильтрацию воспалительными клетками [13].

Известно, что фуллерен C60 не растворим в водных средах, что, безусловно, является существенным препятствием его широкого применения в медицине. Ранее нами была разработана уникальная масштабируемая технология получения стабильной водной дисперсии фуллерена C60, что позволило провести исследования его биологической активности [14]. Следует отметить, что данная технология не включает применения органических растворителей, ультразвуковой обработки и нагревания, что обуславливает биосовместимость и безопасность получаемого раствора. Наша методика позволяет получать высококонцентрированную стабильную ВДФ с концентрацией не менее 1 г/л.

Основной целью настоящей работы был анализ ранозаживляющей активности мазевой композиции на основе ВДФ в экспериментальной модели раневого воспалительного процесса, а также оценка влияния ВДФ на экспрессию генов-маркеров, участвующих в регенеративном процессе, анализ антибактериальной активности КП и оценка перспективности создания комплексов на основе КП и фуллерена C60 для терапии раневых поражений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Композиция на основе ВДФ

Для терапии раневых поражений *in vivo* была приготовлена мазь, содержащая ВДФ (состав: ВДФ, вазелин, пальмитат сахарозы в соотношении 40 : 36 : 24 (по массе)), с использованием цифрового гомогенизатора

ИКА 25 в качестве перемешивающего устройства («ВДФ мазь»). Водный раствор фуллерена C60 был получен с использованием диализного метода [14]. Этот метод биосовместим и не включает использование токсичных органических растворителей, ультразвуковой обработки и нагревания. При этом обеспечивается высокий выход фуллерена C60 из кристаллического состояния в раствор (концентрация стерильного раствора фуллерена C60 составляла 1 мг/мл). Гидродинамический размер частиц, определенный методом динамического светорассеяния, составлял 100–200 нм.

Моделирование раневого воспалительного процесса *in vivo*

Моделирование раневого процесса [15] осуществляли на самках мышей линии BALB/c в возрасте 4–6 недель (питомник «Столбовая»; Москва, Россия). Животных содержали в следующих условиях: температура воздуха 18–26 °C; автоматическая смена 12-часового светового периода при относительной влажности 30–70%. Все животные имели неограниченный доступ к питьевой воде и корму. Перед выполнением раневых разрезов животных анестезировали 4% раствором изофлурана в течение 2 мин через дыхательные пути, после чего местно вводили 0,5%-й раствор лидокаина. С целью воспроизведения хирургической раны у мышей линии BALB/c вырезали фрагмент кожи (1 × 1 см) со спины. Мазь ВДФ наносили на раневую поверхность (40 мкг C60/мышь) через 24 ч после операции (группа «мазь ВДФ»). В качестве положительного контроля использовали широко применяемое терапевтическое средство — крем для лечения хирургических ран (группа «К+»). Мазь, содержащая изотонический раствор — фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline, PBS) вместо ВДФ, использовали в качестве отрицательного контроля (группа «PBS»). Группа «интактные» (без повреждения кожи) также использовалась в качестве отрицательного контроля. Перечисленные составы применяли один раз в сутки в течение 11 дней. На 12-й день мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и собирали образцы кожи для количественного ПЦР-анализа.

Оценка эффективности заживления ран

Скорость заживления кожи оценивали, измеряя площадь раны в продольном и поперечном направлениях (мм), ежедневно, после чего рассчитывали площадь раны по формуле:

$$S_{el} = \pi ab,$$

где S_{el} — площадь эллипса, a — большая полуось (половина длинного диаметра или поперечного размера), b — полуось (половина короткого диаметра или продольного размера).

Эффективность заживления раны (X) рассчитывали в процентах по формуле:

$$X = (1 - S_k/S_i) \times 100\%,$$

где S_k — конечная площадь раны, S_i — начальная площадь раны [16].

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Суммарную РНК из образцов кожи экстрагировали с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf; Франция) в соответствии с инструкциями

производителя; кДНК синтезировали с использованием набора «Реверта-Л» («Интерлабсервис»; Россия). Продукт реакции обратной транскрипции амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием системы определения ПЦР-РВ iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories; США) и набора PCR Mix («Синтол»; Россия).

Расчеты для определения относительного уровня экспрессии генов были выполнены с использованием сравнительного C_t метода (ΔC_t) относительно mHPRT.

Относительную количественную оценку ПЦР-РВ использовали для выявления изменений в экспрессии генов-мишеней по отношению к эталонному гену, которым является ген *hprt* мыши. Количественные результаты ПЦР для экспрессии мРНК сравнивали в виде значений ΔC_t , рассчитанных по формуле: отношение (эталон/мишень) = $2^{C_t(hprt) - C_t(\text{целевой ген})}$ [17].

Оценка антибактериальной активности ВДФ и катионных пептидов

Антибактериальную активность ВДФ и синтезированных пептидов оценивали *in vitro* на примере штамма *E. coli* Dh5α методом подсчета колоний в сравнении с известным антибиотиком ампициллином, который был выбран в качестве положительного контроля. В рамках метода бактериальную суспензию инкубировали с различными концентрациями КАМП в жидкой питательной среде LB в течение 4 ч при 37 °C, а затем в виде капель наносили на поверхность подсушенной агаровой среды. Посев инкубировали в течение ночи при 37 °C.

Важно отметить, что вышеупомянутый штамм *E. coli* не является патогенным и неустойчив к антибиотикам. Активность пептидов в отношении выбранного штамма оценивали, основываясь на определении минимальной бактерицидной концентрации.

Синтез катионных пептидов

Синтез пептидов проводили твердофазным методом, используя автоматический синтезатор пептидов PS3 Peptide Synthesizer (Gyros Protein Technologies Inc.; США) по протоколу Fmoc-химии, используя смесь N-гидроксисбензотриазола с диизопропилкарбодиимидом (HOBt/DIC) как конденсирующий агент. В синтезе использовали стартовые Fmoc-аминоацил-полимеры, смоле гелевого типа Rink Amide Chem Matrix. Боковые карбоксильные и гидроксильные группы аминокислот несли защиту в форме третбутильной группы (t-Bu), ε-аминогруппа лизина — в форме Boc, SH-группа цистеина — Trt, гуанидиновая функция аргинина — Pbf, карбоксильные и гидроксильные группы аминокислот имели защиту в форме трет-бутиловых эфиров. Стандартный цикл включал: промывку (ДМФА), удаление Fmoc-защиты (20% 4-метил-пиперидин в ДМФА), предварительное активирование Fmoc-аминокислоты (DIC/HOBt) и реакцию конденсации в среде ДМФА/N-метилпирролидон при двухкратном избытке карбоксильного компонента (~0,5–1 ч). Контроль за полнотой реакции осуществляли методом Кайзера (нингидриновый тест) и при необходимости реакцию конденсации повторяли (0,5 ч). Конечные пептиды отщепляли от полимера трифторуксусной кислотой в присутствии скавенджеров (триизопропилсилан, этандиол, вода, диметилсульфид). Сырой продукт осаждали сухим метил-третбутиловым эфиром, затем

пептид экстрагировали водной уксусной кислотой и экстракт лиофилизировали (сублиматор VirTis AdVantage 2.0 EL; SP Scientific, США). Пептиды очищали препаративной ВЭЖХ-хроматографией (LC-20 Shimadzu; Япония) на колонке с обращенной фазой (C18), используя ацетонитрил — 0,1% водная трифторуксусная кислота в качестве подвижной фазы (градиентная элюция). Полученные пептиды анализировали на гомогенность методом зонного капиллярного электрофореза на приборе Капель-105М (Люмекс; Россия) с фотометрической детекцией при 226 нм. Молекулярную массу анализировали, используя масс-спектрометр Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics; США).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft Inc.; США). Статистическую значимость определяли по критерию Стьюдента. Данные считали значительно различающимися, если $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка регенеративных эффектов ВДФ на модели раневого воспалительного процесса *in vivo*

На модели раневого поражения проведен анализ регенеративной активности мази на основе ВДФ в сравнении с коммерческим лекарственным средством («К+», положительный контроль). Визуальную оценку процесса заживления ран проводили индивидуально для каждой мыши путем измерения площади поражения. Исходная средняя площадь повреждения составила $143,5 \pm 6,1$ мм² (группа «до лечения»). В последний день эксперимента площадь поражения по группам составила: «без лечения» — $44,4 \pm 6,5$ мм², «мазь ВДФ» — $14,8 \pm 2,7$ мм², «К+» — $26,0 \pm 2,6$ мм². Эти цифры показывают, что заживление при обработке ран ВДФ было эффективным, и скорость заживления была сравнима с группой положительного контроля и даже несколько превосходила последний. Поскольку визуальная оценка заживления является субъективным параметром, был проведен статистический анализ площади раны между группами, показавший статистическую значимость различий между значениями групп «мазь ВДФ» и «К+», которые, в свою очередь, достоверно отличались от значений группы «PBS». Установлено, что если для обработки хирургической раны использовали мазь ВДФ, то остаточная площадь раны была наименьшей.

Оценка уровня экспрессии патогенетически значимых генов

Для оценки способности ВДФ влиять на патогенетически значимые факторы регенеративного процесса был проведен анализ уровня экспрессии ряда генов. Величину экспрессии генов в коже мышей с раневым поражением с/без обработки ВДФ определяли методом ПЦР-РВ. Было показано, что во всех экспериментальных группах, где животные получали ВДФ, уровень экспрессии такого провоспалительного фактора, как *tnf α* , который продуцируется в ответ на внедрение патогенов и повреждение тканей, а также стимулирует развитие

местной воспалительной реакции, был значительно снижен по сравнению с группой животных, не проходивших терапию («PBS»). Уровень экспрессии генов других провоспалительных цитокинов, таких как *il6* и *il1a*, также был значительно снижен у мышей с раневым поражением, которых лечили ВДФ, по сравнению с животными без терапии. Кроме того, нами было выявлено наличие способности фуллерена C60 усиливать экспрессию фактора HMGB1, который нарушает синтез коллагена и может обуславливать безрубцовое заживление ткани, наблюдаемое при обработке ВДФ.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о способности фуллерена C60 ингибировать экспрессию генов провоспалительных цитокинов, что обуславливает наличие у данного вещества противовоспалительного эффекта, который, вероятно, способствует ускорению процесса заживления.

Дизайн катионных пептидов

КП широко распространены в природе и продуцируются практически всеми организмами как часть неспецифической иммунной системы. Эти соединения первоначально рассматривали как потенциальные заменители антибиотиков, но оказалось, что они имеют более широкий спектр терапевтических эффектов, включая воздействия на вирусы, бактерии, микробные биопленки. Природные КП представляют собой линейные молекулы, содержащие до 50 аминокислот, с высокой долей гидрофобных и катионных остатков, что заставляет молекулы сворачиваться в амфипатические структуры с образованием α -спиралей и β -листов. За счет высокого содержания цистеина и образования дисульфидных связей такие пептиды формируют специфические петлевые конформации. Подавляющее большинство природных антимикробных КП имеют заряды от +3 до +9. Механизм их действия связан, в первую очередь, с повреждением клеточной мембраны [18]. В настоящее время технологии позволяют создавать структуры, сильно отличающиеся в топологическом отношении от природных конструкций, включая дендримерные структуры, не встречающиеся в природе. Конструирование аминокислотной последовательности включало создание конструкции с низкой токсичностью, стабильной в сывороточной среде, при этом структура должна демонстрировать значительную эффективность в стимуляции трансфекции. План также предполагал создание модульных конструкций. Одним из таких модулей является N-концевой суперкатионный участок, представленный остатками аргинина и/или лизина, он необходим для взаимодействия с НК и с поверхностью клетки. Центральный модуль представлен гидрофобным ядром из остатков лизина и короткими гидрофобными/амфифильными вставками. С-концевой модуль формирует также гидрофобный участок, обеспечивающий дополнительное сродство с мембраной клетки, и содержит остаток цистеина со свободной тиольной группой, предназначенной для присоединения репортерной метки.

В механизме повреждения мембраны важную роль играют гидрофобные взаимодействия между алифатическими цепями липидных мембран и гидрофобными остатками пептида, что способствует его включению в бислой мембраны через различные пути взаимодействия, например, путем образования пор. В модели «ковра» (carpet) катионный пептид, взаимодействуя с внешним фосфолипидным слоем

Таблица. Перечень катионных пептидов, продемонстрировавших антибактериальную активность в отношении *E. coli Dh5α*

Наименование пептида	Структура	Заряд	Молекулярная масса, Да
AB-1	Линейная	+ 8	1736
AB-3	Линейная	+ 12	3328
AB-4	Дендримерная	+ 11	2758
ST-10	Дендримерная	+ 8	2749

мембраны, располагается параллельно клетке, покрывая ее насыщающим образом. При достигнутом пороговом значении пептиды начинают вращаться, внедряются в мембрану, вызывая ее пермебилизацию. Особый интерес представляют разветвленные структуры — дендримерные КП. Следует отметить, что они обладают значительно большей устойчивостью к протеолитическим ферментам, в то же время меньшей токсичностью по сравнению с линейными пептидами аналогичного аминокислотного состава. При этом связывание с клетками у них сильнее благодаря кооперативным эффектам ввиду наличия у молекулы нескольких цепей. Наши ранние эксперименты демонстрировали их высокую проникаемость через клеточные мембраны, благодаря чему их можно использовать как носители для трансфекции клеток, для переноса генов и других биологически активных соединений [19].

Оценка антибактериальной активности ВДФ и катионных пептидов

В рамках изучения антибактериальной активности ВДФ и КП нами было показано, что ВДФ не имела бактерицидной активности и не обладала способностью ингибировать рост бактерий. Далее нами был проведен анализ ряда КП, которые, исходя из своих структурных характеристик, должны были обладать потенциальной антибактериальной активностью. Так, из 35 синтезированных нами линейных и дендримерных КАМП с молекулярной массой не более 4,5 кДа, четыре катионных пептида, а именно линейные пептиды AB-1, AB-3 и дендримерные пептиды AB-4, ST-10, продемонстрировали разную степень ингибирования роста бактериальной культуры *E. coli Dh5α*, а также определенную бактерицидную активность в отношении данного штамма (см. табл.).

Методом подсчета колоний нами была определена минимальная бактерицидная концентрация катионных пептидов, т. е. минимальная концентрация, вызывающая полную гибель бактерий в стандартных условиях опыта.

Таким образом, МБК для пептида AB-1 составила 1,15 мМ. При этом следует отметить, что в концентрации 0,23 мМ (в пять раз ниже бактерицидной) пептид AB-1 не показал какой-либо существенной активности в отношении данной бактериальной культуры, что указывает на крайне узкий рабочий диапазон концентраций пептида (рис. 1).

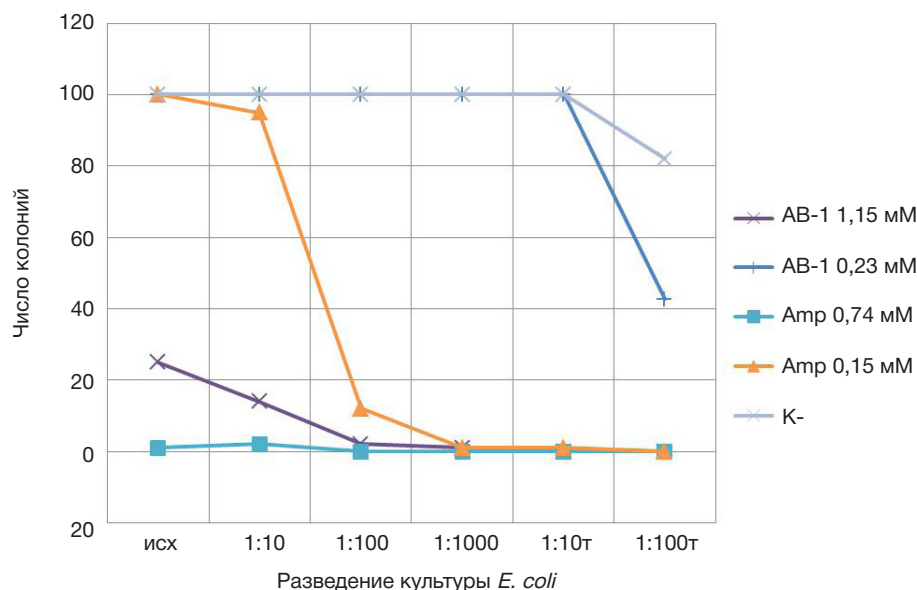
Пептид AB-3 обладал более выраженной, по сравнению с AB-1, бактерицидной активностью в отношении штамма *E. coli Dh5α* (рис. 2).

МБК для данного пептида составляла 0,11 мМ. При этом активность ампициллина в соответствующих дозах была примерно в 6 раз ниже. МБК ампициллина составляла 0,74 мМ.

Исследуемый пептид AB-4 проявлял существенную бактерицидную активность, сравнимую с контрольным антибиотиком ампициллином. МБК для данного пептида составляло 0,74 мМ (рис. 3).

МБК для дендримерного пептида ST-10 составила 0,74 мМ (рис. 4).

Указанная концентрация является минимальной, при которой наблюдается близкая к 100% гибель клеток. Следует отметить, что уровень проявленной пептидом ST-10 активности был несколько выше относительно контрольного образца антибиотика ампициллина. Так, при сопоставимых концентрациях 0,15 мМ и одинаковом разведении *E. coli* (1 : 10) видно, что количество обнаруживаемых бактериальных колоний культуры, обработанной пептидом ST-10, существенно меньше, чем при обработке ампициллином, и составляет 16 и 95 соответственно. Таким образом, под действием 0,15 мМ пептида и антибиотика эффект

**Рис. 1.** Интенсивность роста бактерий под воздействием пептида AB-1

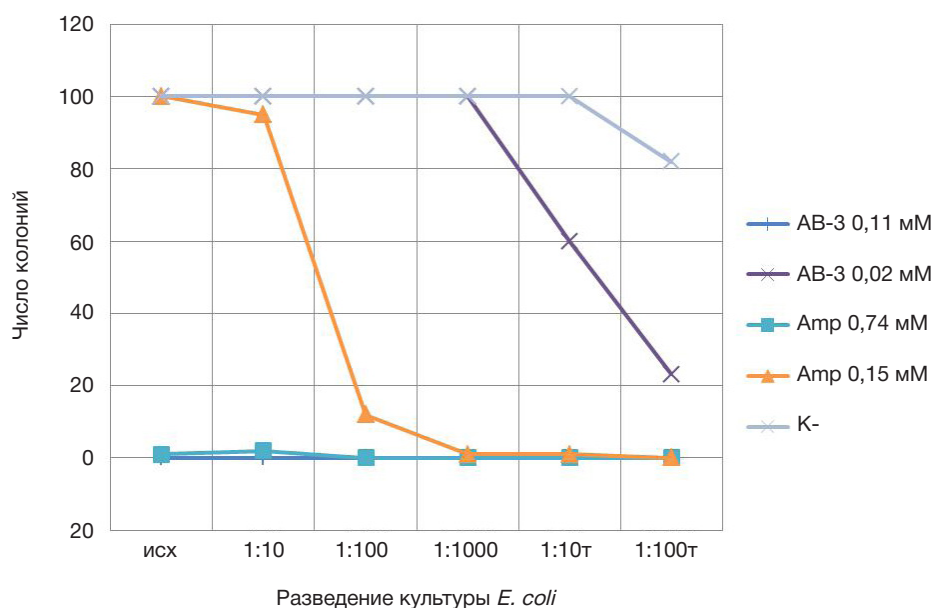


Рис. 2. Интенсивность роста бактерий под воздействием пептида АВ-3

ингибирования роста бактериальной культуры был существеннее у ST-10.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В большинстве случаев ранения сопровождаются кровотечением из поврежденных сосудов и выбросом в окружающие ткани медиаторов воспаления, таких как серотонин, гистамин, вазоактивные вещества и цитокины. Нормальное заживление включает следующие фазы: воспаление, пролиферацию, созревание и ремоделирование. С целью определения регенеративной активности ВДФ мы оценивали экспрессию ряда генов-маркеров, в том числе *tnfa*, *il6* и *il1α*, участвующих в регенеративном процессе, с помощью ПЦР-РВ. Увеличение экспрессии этих цитокинов наблюдается во время воспалительной фазы заживления. Известно, что TNFα стимулирует выработку не только IL1, IL6, но и других провоспалительных цитокинов [20, 21]. IL6 является одним из важнейших медиаторов острой

фазы воспаления. Известно, что у мышей с дефицитом IL6 наблюдается задержка реэпителизации раны. Однако избыточный уровень IL6 служит сигналом для подавления пролиферации фибробластов на поздней стадии раны и приводит к образованию рубца [22]. Что касается IL1α, то ранее было показано, что он стимулирует выработку коллагеназы, и сверхэкспрессия данного цитокина может быть связана с нарушением заживления ран из-за расщепления коллагена. Умеренное увеличение уровня экспрессии гена *il1α* впоследствии опосредует пролиферацию кератиноцитов в месте раны [23]. Уровни *il1α* низкие в раневой жидкости из острых ран, но повышены в жидкости из хронических ран.

Так, подавление экспрессии *tnfa*, *il6* и *il1α* под действием фуллерена C60 указывает на наличие у него не только противовоспалительного эффекта, но и способности препятствовать хронизации раневого процесса [15]. Ранее на модели атопического дерматита нами была показана противоаллергическая активность ВДФ с ингибированием Th1-цитокинов, а также увеличение экспрессии генов

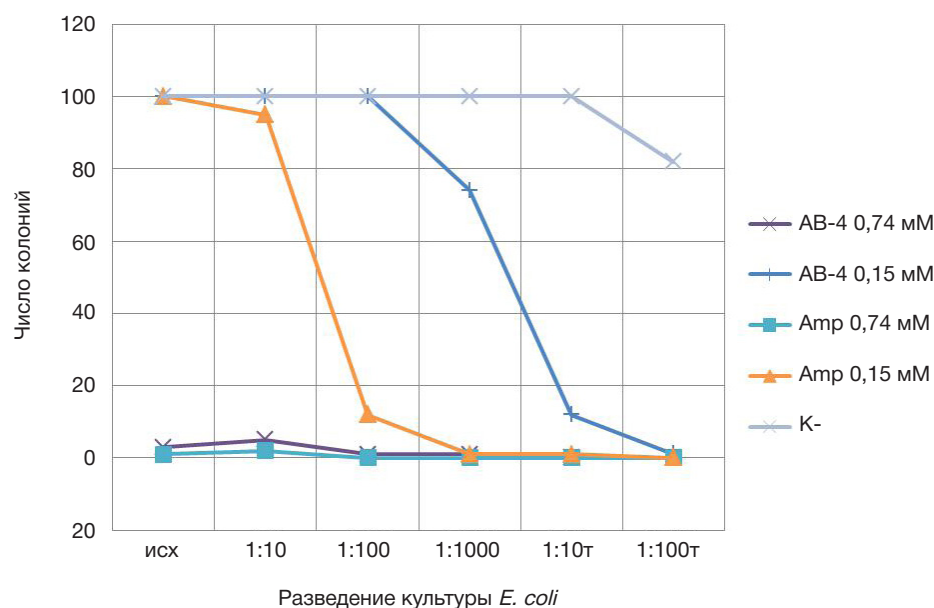


Рис. 3. Интенсивность роста бактерий под воздействием пептида АВ-4

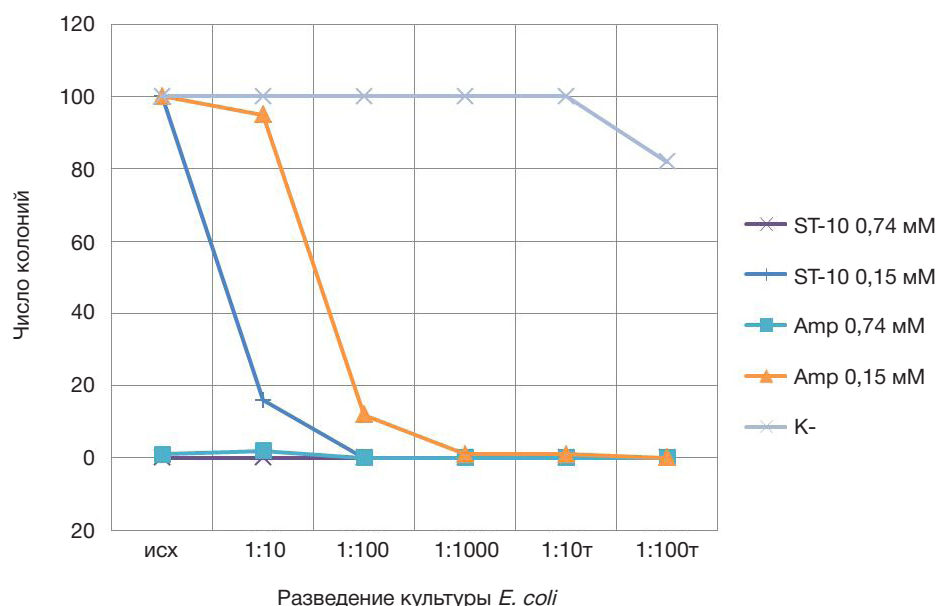


Рис. 4. Интенсивность роста бактерий под воздействием пептида ST-10

Foxp3 и FLG (филаггрин) [24]. Таким образом, ВДФ проявила способность подавлять воспалительный процесс не только при раневом поражении, но и при аллергии, что делает ее перспективным соединением для терапии воспалительных заболеваний кожи.

Раневой процесс часто сопровождается присоединением вторичной бактериальной инфекции. Известно, что КАМП обладают широким спектром антимикробной и иммуномодулирующей активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, биопленок, вирусов, грибов и паразитов и эффективны против штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Важно отметить, что, вследствие высокой скорости бактерицидного действия КАМП, разнообразия механизмов действия и мишеней, вероятность развития резистентности к катионным пептидам крайне мала и требует наличия множественных мутаций, в частности, опосредующих изменение структуры клеточной стенки [25–27]. Вышеперечисленное делает КАМП перспективными соединениями для создания на их основе антибактериальных препаратов, а понимание того, как свойства антимикробных пептидов зависят от аминокислотной последовательности, позволит в будущем своевременно реагировать на появление новых устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий за счет целенаправленной реконструкции пептидных последовательностей [28].

В рамках проведения текущих исследований нами была создана библиотека КАМП, которые предположительно должны обладать высокой противомикробной активностью и низкой токсичностью. Для разработки панели КП мы опирались на базы данных уже имеющихся пептидов, а также на данные литературы по биологической (антибактериальной) активности КП. Таким образом,

пептидные последовательности мы конструировали с учетом содержания положительно заряженных аминокислот, гидрофобных аминокислот. Кроме того, при конструировании последовательностей были получены как линейные, так и дендримерные молекулы.

Так, определив некие правила создания катионных пептидов с антибактериальной активностью, мы рассчитываем в дальнейшем создать более активные КП. Противовоспалительная активность ВДФ делает привлекательной идею разработки гибридных молекул на основе КП и ВДФ.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования были разработаны и синтезированы КП, обладающие антибактериальной активностью. Так, пептиды AB-1, AB-2, AB-3 и ST-10, на наш взгляд, перспективны для создания на их основе противомикробных препаратов. В рамках дальнейших исследований мы планируем разработать на основе КП и фуллерена C60 гибридные соединения для сочетания противовоспалительной и ранозаживляющей активности с антибактериальной активностью. Фуллерен может выполнять роль несущей платформы для КП. Поскольку поверхность сферической молекулы фуллерена довольно большая, к ней можно присоединять до 4–8 молекул пептида. Такая мультивалентная структура менее подвержена биodeградации, и антимикробная активность может повышаться за счет кооперативного эффекта, одновременного присоединения нескольких цепей КП к клеточной мембране бактерии. Необходимо также учесть, что сам фуллерен C60, а также его аминокислотные аддукты обладают способностью проникать через биологические мембраны.

Литература

1. The report "Scar Treatment Market Size, Share & Trends Analysis Report By Scar Type, By Product, By End Use And Segment Forecasts, 2019–2026". GLOBE NEWSWIRE. New York, 2019.
2. Beyene RT, Derryberry SL Jr, Barbul A. The Effect of Comorbidities on Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 2020; 100 (4): 695–705. DOI: 10.1016/j.suc.2020.05.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32681870.

3. Sachdeva C, Satyamoorthy K, Murali TS. Microbial Interplay in Skin and Chronic Wounds. *Curr Clin Micro Rpt.* 2022; 9: 21–31. DOI: 10.1007/s40588-022-00180-4.
4. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens.* 2019; 9: 6. DOI: 10.3390/pathogens9010006.
5. Puca V, Marulli RZ, Grande R, Vitale I, Niro A, Molinaro G, et al. Microbial Species Isolated from Infected Wounds and Antimicrobial Resistance Analysis: Data Emerging from a Three-Years Retrospective Study. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (10): 1162. PubMed PMID: 34680743; PubMed PMCID: PMC8532735.
6. Прохоров Д. В., Щербенёва А. А., Нгема М. В., Испириян М. Б., Кузнецова М. Ю. Современные методы комплексного лечения и профилактики рубцов кожи. *Крымский терапевтический журнал.* 2021; 1: 26–31.
7. Puca V, Traini T, Guarneri S, Carradori S, Sisto F, Macchione N, et al. The Antibiofilm Effect of a Medical Device Containing TIAB on Microorganisms Associated with Surgical Site Infection. *Molecules.* 2019; 24 (12): 2280. PubMed PMID: 31248162; PubMed PMCID: PMC6630542.
8. Geitani R, Ayoub Moubareck C, Touqui L, Karam Sarkis D. Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2019; 19 (1): 54.
9. Samanta I, Bandyopadhyay S. *Streptococcus*. In: *Antimicrobial Resistance in Agriculture*. United States Cambridge: Academic Press in an imprint of Elsevier, 2020; p. 217–232.
10. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19: 311–32. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
11. Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem.* 2003; 38 (11–12): 913–23. PubMed PMID: 14642323.
12. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005; 5 (12): 2578–85. PubMed PMID: 16351219.
13. Zhou Z, Joslin S, Dellinger A, Ehrlich M, Brooks B, Ren Q, et al. A novel class of compounds with cutaneous wound healing properties. *J Biomed Nanotechnol.* 2010; 6 (5): 605–11. PubMed PMID: 21329053.
14. Andreev S, Purgina D, Bashkatova E, Garshev A, Maerle A, Andreev I, et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2015; 23: 792–800.
15. Shershakova NN, Andreev SM, Tomchuk AA, Makarova EA, Nikonova AA, Turetskiy EA, et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by "green technology". *Nanomedicine.* 2023; 47: 102619. Epub 2022 Oct 19.
16. Молчанова В. И., Чикаловцев И. В., Черников О. В., Попов А. М., Кривошапко О. Н., Лукьянов П. А. Сравнительное изучение биологической активности биогликанов из дальневосточной мидии *crenomytilus grayanus*. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2012; 1 (47): 47–50.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-(Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–8. PubMed PMID: 11846609.
18. Шамова О. В., Жаркова М. С., Чернов А. Н., Владимиров Е. В., Сухарева М. С., Комлев А. С. и др. Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2021; 1 (1): 146–72.
19. Kozhikhova KV, Shilovskiy IP, Shatilov AA, Timofeeva AV, Turetskiy EA, Vishniakova LI, et al. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus. *J. Mater. Chemistry B.* 2020; 8 (13): 2607–17. DOI: 10.1039/c9tb02485a.
20. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83 (3): 835–70. PubMed PMID: 12843410.
21. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012; 20 (1): 38–49. Epub 2011 Dec 8. PubMed PMID: 22151742; PubMed PMCID: PMC3287056.
22. Stockmann C, Kirmse S, Helfrich I, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, et al. A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol.* 2011; 131 (3): 797–801. Epub 2010 Nov 25. PubMed PMID: 21107350.
23. Robertson FM, Pellegrini AE, Ross MR, Oberyszyn AS, Boros LG, Bijur GN, et al. Interleukin-1α gene expression during wound healing. *Wound Rep Reg.* 1995; 3 (4): 473–84. PubMed PMID: 17147659.
24. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyshnikov O, et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology.* 2016; 14: 8. PubMed PMID: 26810232; PubMed PMCID: PMC4727272.
25. Spohn R, Daruka L, Lázár V, et al. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4538. PubMed PMID: 31586049; PubMed PMCID: PMC6778101.
26. Jangir PK, Ogunlana L, MacLean RC. Evolutionary constraints on the acquisition of antimicrobial peptide resistance in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 2021; 29 (12): 1058–1061. Epub 2021 Apr 6. PubMed PMID: 33836929. PubMed PMID: 32355003; PubMed PMCID: PMC8097767.
27. Lazzaro BP, Zasloff M, Roff J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution. *Science.* 2020; 368 (6490): eaau5480. PubMed PMID: 32355003; PubMed PMCID: PMC8097767.
28. Falanga A, Del Genio V, Galdiero S. Peptides and Dendrimers: How to Combat Viral and Bacterial Infections. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (1): 101.

References

1. The report "Scar Treatment Market Size, Share & Trends Analysis Report By Scar Type, By Product, By End Use And Segment Forecasts, 2019–2026". GLOBE NEWSWIRE. New York, 2019.
2. Beyene RT, Derryberry SL Jr, Barbul A. The Effect of Comorbidities on Wound Healing. *Surg Clin North Am.* 2020; 100 (4): 695–705. DOI: 10.1016/j.suc.2020.05.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32681870.
3. Sachdeva C, Satyamoorthy K, Murali TS. Microbial Interplay in Skin and Chronic Wounds. *Curr Clin Micro Rpt.* 2022; 9: 21–31. DOI: 10.1007/s40588-022-00180-4.
4. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens.* 2019; 9: 6. DOI: 10.3390/pathogens9010006.
5. Puca V, Marulli RZ, Grande R, Vitale I, Niro A, Molinaro G, et al. Microbial Species Isolated from Infected Wounds and Antimicrobial Resistance Analysis: Data Emerging from a Three-Years Retrospective Study. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (10): 1162. PubMed PMID: 34680743; PubMed PMCID: PMC8532735.
6. Prohorov DV, Shherbenyova AA, Ngema MV, Ispiryian MB, Kuznecova MYu. Sovremennye metody kompleksnogo lecheniya i profilaktiki rubcov kozhi. *Krymskij terapevticheskij zhurnal.* 2021; 1: 26–31. Russian.
7. Puca V, Traini T, Guarneri S, Carradori S, Sisto F, Macchione N, et al. The Antibiofilm Effect of a Medical Device Containing TIAB on Microorganisms Associated with Surgical Site Infection. *Molecules.* 2019; 24 (12): 2280. PubMed PMID: 31248162; PubMed PMCID: PMC6630542.
8. Geitani R, Ayoub Moubareck C, Touqui L, Karam Sarkis D.

- Cationic antimicrobial peptides: alternatives and/or adjuvants to antibiotics active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2019; 19 (1): 54.
9. Samanta I, Bandyopadhyay S. Streptococcus. In: Antimicrobial Resistance in Agriculture. United States Cambridge: Academic Press in an imprint of Elsevier, 2020; p. 217–232.
 10. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19: 311–32. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
 11. Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem.* 2003; 38 (11–12): 913–23. PubMed PMID: 14642323.
 12. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.* 2005; 5 (12): 2578–85. PubMed PMID: 16351219.
 13. Zhou Z, Joslin S, Dellinger A, Ehrich M, Brooks B, Ren Q, et al. A novel class of compounds with cutaneous wound healing properties. *J Biomed Nanotechnol.* 2010; 6 (5): 605–11. PubMed PMID: 21329053.
 14. Andreev S, Purgina D, Bashkatova E, Garshev A, Maerle A, Andreev I, et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2015; 23: 792–800.
 15. Shershakova NN, Andreev SM, Tomchuk AA, Makarova EA, Nikonova AA, Turetskiy EA, et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by "green technology". *Nanomedicine.* 2023; 47: 102619. Epub 2022 Oct 19.
 16. Molchanova VI, Chikalovec IV, Chernikov OV, Popov AM, Krivoshapko ON, Lukyanov PA. Sravnitel'noe izuchenie biologicheskoy aktivnosti bioglikanov iz dal'nevostochnoj midii *crenomytilus grayanus*. *Tixookeanskij medicinskij zhurnal.* 2012; 1 (47): 47–50. Russian.
 17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–8. PubMed PMID: 11846609.
 18. Shamova OV, Zharkova MS, Chernov AN, Vladimirova EV, Suxareva MS, Komlev AS. i dr. Antimikrobnye peptidy vrozhdennogo immuniteta kak prototipy novyx sredstv bor'by s antibiotikorezistentnymi bakteriyami. *Rossiiskij zhurnal personalizirovannoy mediciny.* 2021; 1 (1): 146–72. Russian. Kozhikhova KV, Shilovskiy IP, Shatilov AA, Timofeeva AV, Turetskiy EA, Vishniakova LI, et al. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus. *J. Mater. Chemistry B.* 2020; 8 (13): 2607–17. DOI: 10.1039/c9tb02485a.
 19. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83 (3): 835–70. PubMed PMID: 12843410.
 20. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012; 20 (1): 38–49. Epub 2011 Dec 8. PubMed PMID: 22151742; PubMed PMCID: PMC3287056.
 21. Stockmann C, Kirmse S, Helfrich I, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, et al. A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol.* 2011; 131 (3): 797–801. Epub 2010 Nov 25. PubMed PMID: 21107350.
 22. Robertson FM, Pellegrini AE, Ross MR, Oberyszyn AS, Boros LG, Bijur GN, et al. Interleukin-1α gene expression during wound healing. *Wound Rep Reg.* 1995; 3 (4): 473–84. PubMed PMID: 17147659.
 23. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyshnikov O, et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J Nanobiotechnology.* 2016; 14: 8. PubMed PMID: 26810232; PubMed PMCID: PMC4727272.
 24. Spohn R, Daruka L, Lázár V, et al. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4538. PubMed PMID: 31586049; PubMed PMCID: PMC6778101.
 25. Jangir PK, Ogunlana L, MacLean RC. Evolutionary constraints on the acquisition of antimicrobial peptide resistance in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 2021; 29 (12): 1058–1061. Epub 2021 Apr 6. PubMed PMID: 33836929. PubMed PMID: 32355003; PubMed PMCID: PMC8097767.
 26. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolf J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution. *Science.* 2020; 368 (6490): eaau5480. PubMed PMID: 32355003; PubMed PMCID: PMC8097767.
 27. Falanga A, Del Genio V, Galdiero S. Peptides and Dendrimers: How to Combat Viral and Bacterial Infections. *Pharmaceutics.* 2021; 13 (1): 101.