

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства

На правах рукописи

ГАЛКИНА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**Изучение противовоспалительной и антибактериальной
активности соединений на основе фуллерена C₆₀ и
катионных пептидов**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Шершакова Надежда Николаевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность темы исследования	7
Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности	8
Степень разработанности темы исследования	9
Цель исследования	10
Задачи исследования	10
Положения, выносимые на защиту	11
Научная новизна работы.....	11
Теоретическая значимость работы	12
Научно-практическая значимость работы	13
Внедрение результатов исследования в практику	14
Методология и методы исследования.....	14
Степень достоверности результатов исследования	15
Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах	15
Апробация результатов.....	15
Личный вклад автора	16
Объём и структура диссертации	16
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Острое воспаление	17
1.2 Распространение воспалительных заболеваний	19
1.3 Сепсис и эндотоксический шок	20
1.4 Раневое поражение кожи.....	23
1.4.1 Фазы заживления острых ран	24

1.4.1.1 Гемостаз	24
1.4.1.2 Фаза воспаления.....	25
1.4.1.3 Пролиферативная фаза	28
1.4.1.4 Ремоделирование	29
1.5 Подходы к терапии воспалительных заболеваний	30
1.6 Фуллерен C60 как компонент комплексов с катионными антимикробными пептидами.....	32
1.6.1 Определение фуллерена и структурные особенности	32
1.6.2 Свойства фуллерена C60.....	33
1.7 Антимикробные пептиды: классификация и механизмы действия	36
1.7.1 Классификация антимикробных пептидов	39
1.7.2 Механизмы действия антимикробных пептидов.....	44
1.7.3 Недостатки антимикробных пептидов	45
1.8 Комбинированные соединения на основе антимикробных пептидов	47
1.8.1 Комплексы антимикробных пептидов с наночастицами.....	48
1.8.1.1 Комплексы антимикробных пептидов с металлическими наночастицами	48
1.8.1.2 Комплексы антимикробных пептидов с углеродными нанотрубками.....	49
1.9 Резюме	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1 Реагенты и растворители	52
2.2 Получение водной дисперсии фуллерена C60	52
2.3 Получение синтетических катионных антимикробных пептидов	53

2.4 Получение комбинированных соединений на основе катионных пептидов и фуллерена C ₆₀	54
2.5 Культивирование клеточных культур	57
2.6 Анализ антибактериальной активности	59
2.6.1 Метод диффузии в агар с использованием бумажных дисков	60
2.6.2 Метод серийных микроразведений	60
2.6.3 Метод подсчета колоний	61
2.6.4 Метод диффузии в агар без использования бумажных дисков	62
2.7 Анализ цитотоксичности катионных пептидов методом МТТ-теста	62
2.8 Оценка противовоспалительной активности на модели эндотоксического шока <i>in vivo</i>	63
2.8.1 Моделирование нелетального LPS-индуцированного шока <i>in vivo</i>	64
2.8.2 Моделирование летального LPS-индуцированного шока <i>in vivo</i>	65
2.9 Оценка ранозаживляющей активности на модели раневого поражения кожи <i>in vivo</i>	66
2.9.1 Моделирование раневого поражения кожи <i>in vivo</i>	66
2.9.1.1 Оценка ранозаживляющей активности	66
2.9.2 Оценка эффективности заживления хирургической раны	68
2.10 Пробоподготовка биологических образцов	68
2.11 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	70
2.12 Статистический анализ	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	74
3.1 Проектирование и получение катионных пептидов	74
3.2 Изучение антибактериальной активности катионных пептидов	77

3.2.1 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов в отношении лабораторного штамма <i>E. coli</i> Dh5 α	77
3.2.1.1 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков	77
3.2.1.2 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом серийных микроразведений.....	80
3.2.1.3 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом подсчета колоний.....	84
3.2.2 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов в отношении штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки.....	93
3.3 Изучение цитотоксичности катионных пептидов	106
3.4 Получение комбинированных соединений	108
3.5 Изучение антибактериальной активности комбинированных соединений	114
3.5.1 Оценка антибактериальной активности в отношении лабораторного штамма <i>E. coli</i> Dh5 α	114
3.5.2 Оценка антибактериальной активности в отношении штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки	124
3.6 Изучение цитотоксичности комбинированных соединений	133
3.7 Оценка противовоспалительной активности комбинированных соединений на модели состояния эндотоксического шока <i>in vivo</i>	135
3.7.1 Оценка общей и посуточной летальности.....	135
3.7.2 Оценка динамики изменения веса мышей при моделировании состояния эндотоксического шока	137
3.7.3 Оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе	141

3.8 Изучение ранозаживляющей активности комбинированных соединений на модели раневого воспалительного процесса <i>in vivo</i>	177
3.8.1 Визуальная оценка процесса заживления раневого поражения	177
3.8.2 Оценка уровня экспрессии генов патогенетически значимых факторов регенеративного процесса	183
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	196
4.1 Способность комбинированных соединений влиять на выживаемость животных и экспрессию генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при моделировании состояния эндотоксического шока.....	196
4.2 Влияние комбинированных соединений на экспрессию генов патогенетически значимых факторов регенеративного процесса на модели раневого воспалительного процесса <i>in vivo</i>	209
4.3 Проектирование структуры катионных пептидов и их антибактериальная активность в отношении лабораторного штамма кишечной палочки.....	218
4.4 Антимикробная активность комбинированных соединений на примере штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки и устойчивых к антибиотикам	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	232
Итоги	232
Рекомендации	233
Перспективы дальнейшей разработки темы	233
ВЫВОДЫ	235
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	237
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	239

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания воспалительного характера станут наиболее распространенной причиной смерти в течение следующих трех десятилетий.

Воспаление — это защитная реакция организма, направленная на устранение патогенов и восстановление гомеостаза. Избыточное и неконтролируемое воспаление может привести к повреждению тканей и дисфункции органов [52]. Большинство методов лечения острых воспалительных заболеваний базируются на купировании боли и поддерживающем лечении, а использование распространенных лекарственных препаратов часто сопровождается серьезными побочными эффектами. В связи с этим существует необходимость в разработке новых методов лечения воспалительных заболеваний.

В настоящее время активно изучаются перспективы использования водного раствора фуллерена C₆₀ в качестве противовоспалительного агента. Фуллерен C₆₀ способен подавлять как неаллергические, так и аллергические воспаления, что отличает его от большинства известных противовоспалительных препаратов [7, 243, 300]. Показана способность водной дисперсии фуллерена C₆₀ подавлять развитие воспаления *in vivo* и эффективность в качестве сопутствующей терапии для заживления ран [245].

Осознание значимости инфекционно-септических осложнений при воспалительных заболеваниях стимулировало повышенный интерес к созданию терапевтических средств, направленных на борьбу с такими осложнениями, в частности, к разработке новых препаратов, обладающих комбинированным действием, а именно противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью. Способность микроорганизмов развивать резистентность к лекарственным средствам является основным недостатком классических антибактериальных препаратов, поскольку значительно снижает

эффективность терапии. Одними из наиболее перспективных альтернативных агентов с антибактериальной активностью являются катионные пептиды (КП).

Пептиды, как правило, обладают низкой стабильностью *in vivo*, а развитие резистентности к ним маловероятно из-за их механизма действия, направленного на консервативные мишени бактериальных мембран или внутриклеточных процессов. В связи с этим, фуллерен C60 может быть использован как средство доставки для пептидного компонента при формировании стабильного комплекса, не вызывающего развитие лекарственной устойчивости у бактерий.

Таким образом, разработка комбинированных соединений на основе фуллерена C60 и катионных пептидов с противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью является актуальным направлением исследований.

Полученные в ходе данной работы результаты расширяют понимание фундаментальных принципов и механизмов противовоспалительной активности фуллерена, а также имеют прикладное значение относительно разработки терапевтических препаратов на основе фуллерена C60 с расширенным спектром биологической активности.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности

Тема диссертации полностью соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №3 – Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты; №4 – Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении, нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.); №5 – Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний; №6 – Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

Степень разработанности темы исследования

За последние годы накоплено значительное количество данных о биологической активности производных фуллеренов, в частности фуллерена C₆₀. Выявлено, что конъюгаты и комплексы на основе фуллеренов и аминокислот или пептидов могут обладать широким спектром активностей: антиоксидантной [282], антибактериальной [267], мембранотропной [29], противовирусной [146, 159], противоопухолевой [296], нейропротекторной [98] и фотодинамической [274]. Отмечаются перспективы использования водного раствора фуллерена C₆₀ в качестве противовоспалительного средства [243, 245]. Множество зарубежных и отечественных патентов и публикаций по получению органических производных на основе фуллерена подтверждают заинтересованность исследователей в создании и изучении комбинированных соединений на основе фуллеренов. Важно отметить, что большая часть исследований освещает вопросы, связанные с водорастворимыми функционализированными производными фуллерена и лишь в малой степени затрагивает водорастворимые формы немодифицированного фуллерена C₆₀.

Ранее коллективом авторов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России было показано, что создание новых препаратов на основе водорастворимой формы фуллерена C₆₀ является перспективным подходом к терапии воспалительных заболеваний, в том числе при раневом поражении кожи [245]. Также на базе института осуществляются разработка и получение производных фуллерена C₆₀ с аминокислотами и пептидами [30], в том числе обладающими антибактериальной активностью.

В настоящее время активно изучаются катионные антибактериальные пептиды: количество публикаций в базе данных PubMed, соответствующих ключевым словам «антимикробные пептиды» и «пептиды защиты хозяина», возросло от 500 в 2000 году до 3500-4000 в 2019-2023 годах [83], чему способствовала пандемия COVID-19. На момент 2022 года было зарегистрировано около 70 пептидных препаратов (14 зарегистрировано в России)

[92], однако ни для одного из них бактериальные инфекции не были заявлены как область клинического применения.

Анализ научной литературы позволил выявить в данной области исследования ряд аспектов, которые требуют изучения, и которые мы попытались изучить в нашей работе:

- способность водорастворимой формы немодифицированного фуллерена C₆₀ проявлять противовоспалительную активность на моделях *in vivo*;
- механизмы биологического действия водорастворимой формы фуллерена C₆₀ отчасти остаются неясными и требуется, например, понимание того, как фуллерен C₆₀ способен влиять на выработку про- и противовоспалительных факторов *in vivo*;
- влияние биологически активных пептидов и фуллерена C₆₀ на активность друг друга в составе комбинированных соединений.

Поиск решения обозначенных вопросов обуславливает актуальность настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования

Изучить противовоспалительную, ранозаживляющую и антибактериальную активность комбинированных соединений на основе фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов.

Задачи исследования

1. Оценить способность оригинальных катионных пептидов проявлять антибактериальную и цитотоксическую активность *in vitro*;
2. Оценить способность оригинальных катионных пептидов сохранять антибактериальную активность в составе комбинированных соединений с фуллереном C₆₀ *in vitro*;
3. Изучить противовоспалительную активность комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов *in vivo* при моделировании состояния эндотоксического шока;

4. Оценить влияние комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов на экспрессию генов патогенетически значимых факторов, участвующих в развитии воспаления;
5. Изучить способность комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов проявлять ранозаживляющую активность на модели раневого воспаления *in vivo*;
6. Оценить влияние комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов на экспрессию генов факторов, участвующих в процессе ранозаживления.

Положения, выносимые на защиту

Комбинированные соединения фуллерена C₆₀ и оригинальных синтетических катионных пептидов обладают противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностями.

Противовоспалительную и ранозаживляющую активность комбинированных соединений фуллерена C₆₀ определяет структура входящих в их состав катионных пептидов.

Комбинированные соединения фуллерена C₆₀ и катионных пептидов являются перспективной основой для создания безопасных препаратов для терапии воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией.

Научная новизна работы

Впервые получены катионные пептиды с уникальными аминокислотными последовательностями, обладающие выраженной антибактериальной активностью в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий.

Впервые созданы комбинированные соединения фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов, проявляющие противовоспалительную и антибактериальную активность.

Впервые продемонстрирована способность водного раствора фуллерена C₆₀ и его комбинированных соединений с катионными пептидами препятствовать гибели мышей при моделировании состояния эндотоксического шока.

Впервые установлено, что способность фуллерена C60 проявлять регенеративную активность в составе комбинированных соединений может меняться в зависимости от структуры катионного пептида.

Впервые показано, что фуллерен C60 сохраняет свою способность влиять на экспрессию генов патогенетически значимых факторов, участвующих в развитии воспаления и ранозаживлении, в составе комплекса с катионными пептидами.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования определяется получением новых знаний о биологических механизмах действия ВРФ в составе новых комбинированных соединений на воспаление и процессы регенерации. Так, было выявлено, что фуллерен C60 способствует выживаемости мышей при развитии эндотоксического шока, что сопровождается подавлением экспрессии гена *Il1b* и повышением экспрессии *Il1rn*, и сохраняет данную способность в составе комплексов с катионными пептидами. Проведенные исследования показали наличие способности фуллерена C60, в том числе в составе комплексов (K14 и K18) ускорять процесс ранозаживления посредством подавления экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*), индукции генов цитокинов, влияющих на реэпителизацию (*Il10*, *Tgfb1*), влияния на гены кислородного баланса и ангиогенеза (*Hif1a*, *Flg*, *Adora2a*, *Vegfa*, *Fgf2*, *Egf*).

Исследование обогащает теоретическую научную базу разработки новых комбинированных соединений с множественной активностью для оптимизации подходов к терапии воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией. Результаты проведенного исследования вносят вклад в общую теоретико-методологическую базу о перспективах применения комбинированных соединений фуллерена C60 и катионных пептидов и создания подобных средств.

Полученные результаты исследований расширяют современные представления об участии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на ранних этапах развития состояния эндотоксического шока, в частности IL-1RA, IFN- γ и A2aAR. Были подтверждены данные об

опосредованном липополисахаридом (LPS) подавлении экспрессии генов *Ifng* и *Adora2a* при развитии состояния эндотоксического шока. Показано, что повышенная экспрессия гена *Il1rn* через 1 час после введения LPS является предиктором позитивного прогноза при развитии септического шока.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость работы заключается в формулировании и экспериментальном обосновании принципиально нового подхода к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний на основе комбинированных соединений фуллерена C60 и антибактериальных пептидов. Полученные соединения демонстрируют выраженную активность в отношении клинически значимых патогенов, включая полирезистентные штаммы.

Описаны протоколы получения конъюгатов и комплексов, гарантирующие сохранение биологической активности их компонентов и формирующие универсальную платформу для создания новых препаратов путем модификации пептидной структуры или присоединения к фуллерену других биомолекул. Исследование влияния структурных особенностей фуллерена C60 и пептидов на их биологическую активность в комбинированных соединениях создает основу для разработки новых молекул с заданными свойствами и активностью.

Описаны модели эндотоксического шока и хирургической полнокожной раны *in vivo* для самок мышей линии BALB/c, пригодные для изучения противовоспалительной и ранозаживляющей активности различных соединений.

Комбинированные соединения представляют собой основу для создания новых высокоэффективных лекарственных средств для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний. Их ключевыми преимуществами являются: широкий спектр антибактериального действия; комплексное воздействие на инфекцию, воспаление и ранозаживление; сниженный риск развития резистентности. Полученные данные *in vivo* являются основой для планирования доклинических и клинических исследований. Разработанные протоколы способны ускорить процесс создания лекарственных форм, а модификация пептидов позволит направленно получать соединения с усиленной активностью против

конкретных патогенов, улучшенной селективностью и оптимизированной фармакокинетикой.

Таким образом, работа вносит существенный вклад в фундаментальные аспекты преодоления антибиотикорезистентности и разработки комбинированных соединений, предоставляет конкретные методологии и создает перспективную основу для разработки новых препаратов с расширенным спектром биологической активности, способных значительно улучшить лечение тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний.

Внедрение результатов исследования в практику

Методики триметилсилилирования аминокислот и оценки цитотоксической активности комбинированных соединений, описанные в настоящем исследовании, были внедрены в работу ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. В рамках диссертационной работы было получено 3 патента на изобретение. Патент на оригинальные пептидные последовательности (RU2837372C1) защищает использованные в данной работе синтетические антибактериальные пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18. Патент RU2841634C1 охватывает конъюгаты фуллерена C60 и катионных пептидов ASM-45 и ASM-46, а патент RU2841633C1 распространяется на комплексы фуллерена C60 и катионных пептидов K14, K17 и K18.

Методология и методы исследования

Для выполнения диссертационной работы были использованы современные методы исследования. Синтез пептидов проведен стандартными методами твердофазного пептидного синтеза. Оценка антибактериальной активности катионных пептидов, комбинированных соединений осуществлена с использованием метода диффузии в агар, метода серийных микроразведений и метода подсчета колоний. Оценка цитотоксичности катионных пептидов, комбинированных соединений проведена с помощью МТТ-теста. Оценка способности комплексов на основе фуллерена C60 и КП подавлять развитие воспалительного ответа проведена *in vivo* на модели LPS-индуцированного (эндотоксического) шока. Оценка ранозаживляющей активности

комбинированных соединений на основе фуллерена C₆₀ и КП, а также их способности влиять на экспрессию генов факторов, участвующих в процессе заживления ран, проведена *in vivo* на модели полнокожной раны. Обработка первичных результатов проведена с использованием программного обеспечения Microsoft excel, GraphPad Prism 9.

Степень достоверности результатов исследования

Приведённые в диссертации данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения. Достоверность представленных результатов определяется достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, четко сформулированными целью и задачами, использованием информативных методов исследования, адекватных поставленным задачам. В ходе работы были применены адекватные методы математической статистики. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук; получено 3 патента; опубликовано 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Апробация результатов

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

1. Международный гибридный конгресс Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСІ) (Краков, Польша, и Мадрид, Испания, 10-12 июля 2021 г.).

2. Международный конгресс по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC-21 (Москва, Российская Федерация, 2-3 декабря 2021 г.) и IMAC-22 (Москва, Российская Федерация, 1-2 декабря 2022 г.).
3. Школа по аллергологии и иммунологии им. академика Р. М. Хаитова (Москва, Российская Федерация, 21-22 февраля 2024 г.).
4. IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биотехнология: надежды и свершения» (Москва, Российская Федерация, 3 июня 2025 г.).
5. 21-й Международный междисциплинарный конгресс по аллергологии и иммунологии (Москва, Российская Федерация, 6-7 июня, 2025 г.).

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования, непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, личном участии в апробации результатов исследования, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по теме выполненных работ.

Объём и структура диссертации

Диссертация оформлена в традиционном стиле, содержит 271 страницу машинописного текста, 87 рисунков и 22 таблицы. Работа включает «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы», включающий 308 источников, в том числе 20 отечественных и 288 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Воспалительный процесс представляет собой адаптивную реакцию, инициируемую в ответ на потенциально опасные стимулы и состояния, такие как инфекция и повреждение тканей. Чрезмерное и неконтролируемое воспаление может привести к дисфункции органов [52] и лежит в основе ряда острых и хронических заболеваний человека, таких как острое повреждение легких и печени, сепсис, астма, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит и нейродегенеративные заболевания [193]. Острое воспаление, регулируемое врожденной иммунной системой, в большинстве случаев длится от нескольких часов до нескольких дней. Если острая воспалительная реакция чрезмерна или не приводит к устранению воспалительного стимула, воспаление переходит в хроническую (патологическую) фазу и может длиться в масштабе от нескольких недель до нескольких лет [153].

1.1 Острое воспаление

Острое воспаление инициируется патогенными инфекциями или повреждением тканей [193]. Развитие воспалительного ответа зависит от точной природы первоначального стимула и его местоположения в организме, однако все воспалительные реакции имеют общий механизм, который можно обобщить следующим образом: 1) рецептор-опосредованное распознавание чужеродных молекул; 2) активация внутриклеточных сигнальных путей; 3) высвобождение цитокинов; и 4) рекрутирование эффекторных клеток.

Рецепторы распознавания образов (pattern recognition receptors, PRR) представляют собой белки, циркулирующие в крови или экспрессируемые на клетках врожденного иммунитета [26]. Патогены, проникающие в организм через поврежденную кожу, перорально или ингаляционно, распознаются PRR через молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), или молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs), которые запускают воспалительную реакцию [20]. В инфицированном тканевом пространстве

резидентные макрофаги (Мф), дендритные клетки (ДК) и нейтрофилы (Нф) являются первыми клетками, взаимодействующими с патогенами. Активированные Мф и ДК функционируют как антигенпрезентирующие клетки, фагоцитируют инородные тела, мигрируют в лимфатические узлы и представляют процессированный антиген лимфоцитам [193]. Одновременно активированные эндотелиальные клетки выделяют воспалительные цитокины, включая фактор некроза опухоли (TNF- α), интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и IL-17) и интерферон- γ (IFN- γ), которые накапливаются в кровотоке, рекрутируя лейкоциты [63].

Нейтрофилы - первые циркулирующие лейкоциты, привлеченные в инфицированное тканевое пространство. Составляя около 60–70 % всех циркулирующих лейкоцитов у людей, нейтрофилы локализуют воспаление благодаря высвобожденным в зоне проникновения патогена цитокинам и хемокинам. Оказавшись в месте воспаления, нейтрофилы задействуют фагоцитоз, высвобождение активных форм кислорода (АФК), дегрануляцию и производство нейтрофильных внеклеточных ловушек для сдерживания патогенных инфекций [148]. Также, высвобожденные гранулы, продукты некроза и апоптотические нейтрофилы привлекают моноциты (Мо) и адаптивные иммунные клетки для инициирования разрешения воспаления [158].

Стерильные воспаления, такие как механическая травма, сгустки крови или химические раздражители, могут вызывать повреждение на клеточном или тканевом уровне, иницируя высвобождение DAMPs. Высвобожденные DAMPs обнаруживаются резидентными иммунными и эндотелиальными клетками, что приводит к выработке воспалительных цитокинов (TNF- α и IL-1). Эти иммуностимулирующие молекулы также иницируют привлечение нейтрофилов к месту повреждения. Несмотря на отсутствие патогенов при стерильных повреждениях, нейтрофилы по-прежнему используют схожую тактику для сдерживания воспаления, за которым следует эффероцитоз. [20]

Избыточное высвобождение гранул, АФК нейтрофилами из-за их избыточного количества может по-прежнему вызывать повреждение окружающих клеток хозяина [70], что приводит к острым патологическим состояниям, таким как острые повреждения легких и печени или хроническое воспаление.

1.2 Распространение воспалительных заболеваний

Продолжительная воспалительная реакция может быть следствием длительной инфекции, присутствия инородного тела или фонового генетического заболевания. Длительная мобилизация нейтрофилов наряду с повреждением тканей организма хозяина приводит к повышенной продукции воспалительных цитокинов, также известной как цитокиновый шторм [171]. Цитокиновый шторм может вызвать положительную обратную связь, привлекая другие иммунные клетки к месту воспаления, тем самым способствуя повреждению органов [251]. Некоторые из пагубных последствий цитокинового шторма включают в себя изменения в пролиферации иммунных клеток, такие как избыток гранулоцитов и снижение продукции лимфоцитов, что препятствует разрешению воспаления [102]. Наконец, более выраженная инфильтрация нейтрофилов еще больше увеличивает проницаемость сосудов, позволяя патогенам проникать в кровоток, что в конечном итоге вызывает системное воспаление [54].

Врожденный иммунный ответ не ограничивается клеточными компонентами, но также обеспечивается белковыми медиаторами [63]. В крови и интерстициальной жидкости система комплемента активируется в присутствии патогенов через классический, лектиновый или альтернативный путь [115]. Система комплемента опсонизирует инородные тела и ферментативно расщепляет C3 до анафилатоксинов C3a и C5a, вызывая последующее воспаление [115]. Активация комплемента в сочетании с системными воспалительными цитокинами вызывает экспрессию тканевого фактора на эндотелиальных клетках, инициируя путь коагуляции [63]. После запуска, путь коагуляции трудно сдерживать стандартными механизмами обратной связи, такими как антитромбин, активированный протеин С или ингибитор пути тканевого фактора (TFPI),

вследствие чего развивается внутрисосудистая коагуляция и, в конечном итоге, полиорганная недостаточность [63].

1.3 Сепсис и эндотоксический шок

По оценкам, во всем мире сепсис ежегодно становится причиной более 11 миллионов смертей [228], а септический шок, самая тяжелая форма сепсиса, приводит к смерти почти 40 % пациентов при выписке из больницы [276]. Липополисахариды или эндотоксины являются основными компонентами клеточной стенки грам-отрицательных бактерий, которые играют решающую роль в развитии септического (вызванного бактериями) или эндотоксического (вызванного эндотоксинами) шока [41].

Даже в низкой дозе эндотоксин индуцирует реакции, глубоко затрагивающие органы разных систем [272], а попадание в организм высоких доз приводит к типичному повреждению органов: эндотоксический шок, острое повреждение почек, дисфункция печени и повреждение эндотелия с нарушениями коагуляции/эндотелиальной дисфункцией.

Эндотоксин индуцирует воспаление через Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor, TLR) 4 при участии миелоидного фактора дифференцировки 2 (MD-2) и кластера дифференцировки 14 (CD14); последний также требует присутствия липополисахарид-связывающего белка (LBP) (рисунок 1). У людей описано три механизма распознавания липополисахарида врожденной иммунной системой: сигнальный путь рецептора TLR4-MD-2 в ответ на внеклеточный эндотоксин, механизм каспазы 4/5 в ответ на эндотоксин в цитоплазме клеток (например, от внутриклеточной бактериальной инфекции), и механизм, опосредованный комплементом, белки которого связываются с эндотоксином в крови [53]. Упомянутые реакции высококонсервативны и затрагивают несколько дополнительных механизмов (рисунок 1) с участием сывороточных факторов, внутри- и внеклеточных белков.

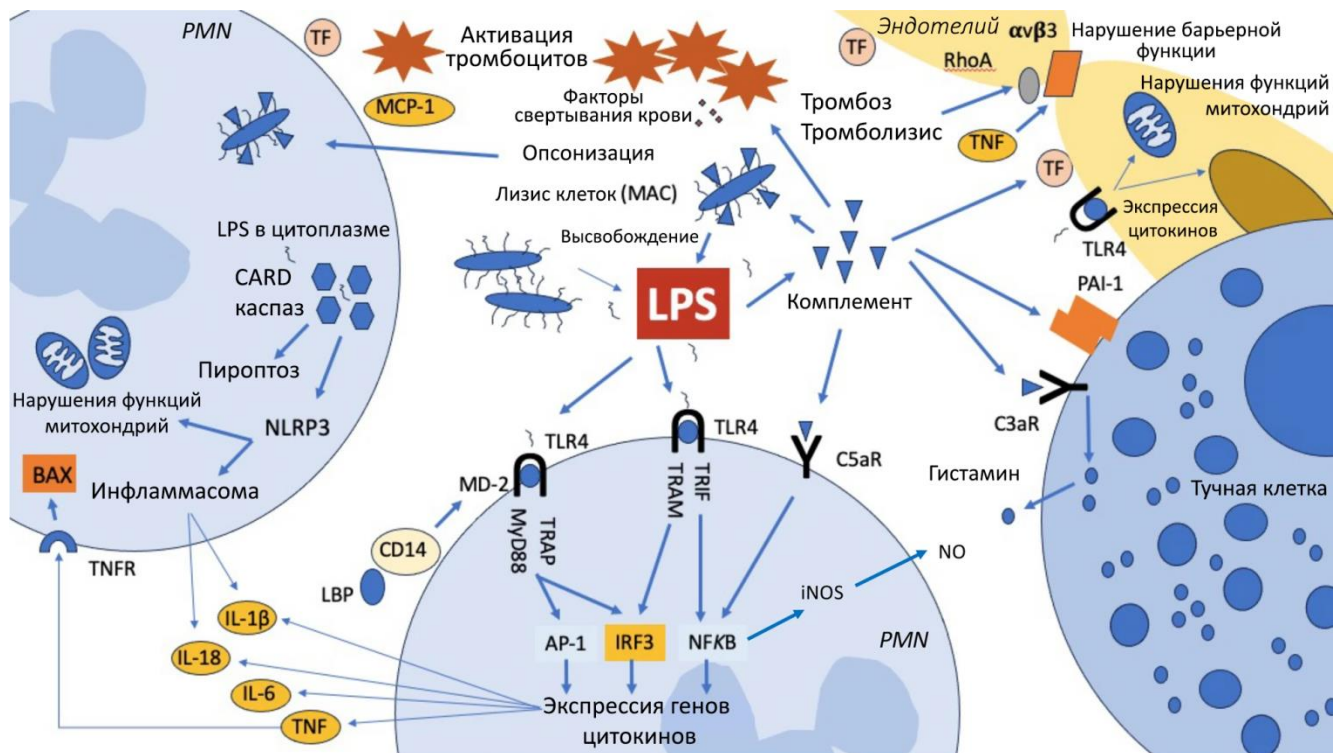


Рисунок 1 – Механизмы эндотоксического септического шока. Доминирующие механизмы LPS-индуцированного повреждения клеток. $\alpha\text{v}\beta 3$ — интегрин альфа- ν бета-3; AP-1 — фактор транскрипции, активаторный белок 1; BAX — BCL2-ассоциированный белок X, регулятор апоптоза; CARD — домены активации и рекрутирования каспаз; iNOS — индуцибельная синтетаза оксида азота; IRF3 — регуляторный фактор интерферона 3; MAC — мембраноатакующий комплекс; MCP-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (лиганд мотива C-C 2, CCL2), MyD88 — первичный ответ миелоидной дифференцировки 88; NF- κ B — ядерный фактор каппа B; NLRP3, домен пирина семейства NLR, содержащий 3; NO — оксид азота; PAI-1 — ингибитор активации плазминогена 1 типа; RhoA — член A семейства генов гомологов Ras; TF — тканевой фактор; TRAM/TRAP/TRIF — молекулы-адаптеры TLR (молекула активатора рецептора тиреоидного гормона/ пептид, активирующий рецептор тромбина/ адаптер, содержащий домен TIR, индуцирующий интерферон-бета (молекула адаптера, содержащая домен TIR 1, TICAM-1)) [141]

Молекулы LPS высвобождаются из стенок грам-отрицательных бактерий в результате самообновления клеточного пула при размножении или гибели бактериальных клеток. Рецепторный комплекс TLR4/MD-2 является основным для внеклеточного LPS и задействует несколько перекрывающихся путей, приводящих к экспрессии цитокинов и других воспалительных молекул. Однако цитоплазматический LPS также воспринимается доменами активации и

рекрутирования каспаз и каспазами 4 и 5, что приводит к NLRP3-опосредованной активации инфламмасомы. Этот процесс также может напрямую приводить к TNF-BAH-опосредованной митохондриальной дисфункции.

Кроме того, LPS является мощным активатором комплемента, а анафилотоксин C5a может напрямую вызывать воспаление, опосредованное NF-κB. Передача сигнала, опосредованная C3a, также приводит к высвобождению гистамина из тучных клеток. Активация комплемента может влиять на коагуляцию различными способами посредством индукции PAI-1 и TF, активируются тромбоциты и запускается каскад свертывания. Фрагменты фибриногена могут вызывать дисфункцию эндотелиального барьера, опосредованную интегринами альфа-v и бета-3 в зависимости от RhoA.

TLR4, первый идентифицированный человеческий Toll-подобный рецептор представляет собой единственный TLR, способный передавать сигнал как через MyD88-зависимый, так и через MyD88-независимый пути. TLR4 действует как специфический рецептор распознавания грам-отрицательных бактериальных липополисахаридов, а также может связывать DAMPs, такие как гиалуроновая кислота, β-дефензин 2, фибриноген и белки теплового шока hsp60 и hsp70 [22]. Связывание лиганда с данным рецептором запускает внутриклеточный сигнальный путь. Каждый TLR имеет схожий цитоплазматический сигнальный домен, который похож на рецептор IL-1, домен TIR. Многочисленные молекулы-адаптеры, имеющие домен TIR, такие как MyD88, TRIF, содержащий домен TIR адаптерный белок/подобный адаптеру MyD88 белок (TIRAP/Mal) и молекула-адаптер, связанная с TRIF (TRAM), взаимодействуют с доменом TIR Toll-подобного рецептора 4 и, таким образом, передают нисходящий сигнал. Кроме того, только TLR4 использует все четыре адаптерные молекулы, а именно MyD88, TIRAP, TRIF и TRAM, для передачи сигнала [21, 140].

MyD88-опосредованный сигнальный путь. После димеризации TLR4 при связывании лиганда, MyD88 рекрутируется и взаимодействует через свой домен TIR с цитоплазматической областью TLR4. Затем NF-κB активируется и

транслоцируется в ядро посредством инициирования деградации его ингибирующего белка I κ -B α под действием киназы IKK. Активирующий белок-1 (AP-1) представляет собой один из факторов транскрипции, который активируется MAPK [140]. Этот сигнальный путь в конечном итоге приводит к выработке нескольких провоспалительных цитокинов и хемокинов.

MyD88-независимый сигнальный путь. TLR4/TRIF-зависимый сигнальный путь инициируется только после того, как рецепторный комплекс интернализуется в эндосомы. Только TLR3 и TLR4 используют данный путь, включающий участие TRIF и IRF-3 и приводящий к продукции интерферонов I типа вместе с провоспалительными цитокинами. IRF-3 и IRF-7 при фосфорилировании димеризуются и транслоцируются в ядро, где они вызывают экспрессию генов, индуцируемых интерфероном [105].

1.4 Раневое поражение кожи

Нарушение процесса заживления ран является важной проблемой для здравоохранения, поскольку для её преодоления необходимы сложные и часто дорогостоящие методы лечения. Миллионы пациентов нуждаются в терапии острых и хронических ран суммарной стоимостью несколько тысяч миллионов долларов. Факторами риска нарушения процесса заживления ран среди населения обычно являются: сахарный диабет, бактериальные и вирусные инфекции, старение и ряд других причин. В связи с этим заживление ран представляет собой важную проблему здравоохранения, что подтверждает тот факт, что в настоящее время выделяется значительное количество стипендий и программ поддержки исследований, связанных с путями решения данного вопроса. Существует потребность во внедрении новых технологий в этой области.

Физиологическое заживление острых повреждений тканей представляет собой строго регулируемый каскадный процесс, последовательно проходящий четыре взаимосвязанные стадии: первичный гемостаз (образование фибринового сгустка), острую воспалительную реакцию (нейтрофильная и макрофагальная инфильтрация), пролиферативную фазу (ангиогенез и фиброплазия) и

заключительное ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса [34]. Хронические раневые поражения, напротив, характеризуются длительными фазами воспаления, пролиферации или ремоделирования, что приводит к фиброзу тканей и незаживающим язвам.

В рамках данной работы мы сосредоточились на изучении острого раневого поражения кожи.

1.4.1 Фазы заживления острых ран

1.4.1.1 Гемостаз

Первая стадия раневого заживления – гемостаз – представляет собой сложный физиологический процесс, направленный на остановку кровотечения и формирование первичного барьера при повреждении сосудистой стенки. Тромбоциты активируются при воздействии внесосудистого коллагена (такого как коллаген I типа), который они детектируют по средствам рецепторов интегрин - рецепторы клеточной поверхности, которые опосредуют взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом. После контакта с коллагеном тромбоциты высвобождают растворимые медиаторы (факторы роста и циклический АМФ) и адгезивные гликопротеины, которые активируют сигнальный путь к агрегации. Факторы роста, высвобождаемые из альфа-гранул тромбоцитов, включают в себя фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), основной фактор роста фибробластов (FGF-b), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Ключевые гликопротеины, высвобождаемые из альфа-гранул тромбоцитов, включают фибриноген, фибронектин, тромбоспондин и фактор фон Виллебранда. По мере агрегации тромбоцитов высвобождаются факторы свертывания, что приводит к образованию фибринового сгустка, который закупоривает повреждение и останавливает кровотечение.

Вместе с тем, Нф и Мо привлекаются PDGF и TGF- β из сосудистой сети для инициирования воспалительного ответа [103]. Имеются данные, что компонент

комплемента C5a также обеспечивает дополнительный хемотаксический сигнал для привлечения нейтрофилов к месту повреждения [178]. Вместе с этим, VEGF, TGF- α и FGF-b активируют эндотелиальные клетки для последующего процесса ангиогенеза. PDGF привлекает фибробласты к месту раневого поражения и активирует их, следствием чего является синтез ими коллагена и гликозаминогликанов - белков внеклеточного матрикса, которые облегчают клеточную миграцию и взаимодействие с поддерживающим каркасом матрикса. Таким образом, процесс заживления начинается с гемостаза, скопления тромбоцитов в месте повреждения и взаимодействия растворимых медиаторов и факторов роста с внеклеточным матриксом [236]. Продолжительность этой фазы составляет несколько минут [60].

1.4.1.2 Фаза воспаления

Тучные клетки (ТК), Нф, Мо и Мф являются ключевыми клетками воспалительной фазы заживления раны. Во время воспалительной фазы ТК способствуют вазодилатации путем секреции гистамина или серотонина. Это событие включает диапедез Нф и Мо, что стимулирует фагоцитоз патогенов и/или поврежденных клеток. В то же время, лейкоциты и кератиноциты секретируют цитокины и факторы роста для инициирования пролиферативной фазы. Продолжительность этой фазы в среднем составляет до 3 дней [60, 72]. Важная роль в воспалительной фазе заживления раны принадлежит хемокинам, которые привлекают нейтрофилы и лимфоциты для координации ранних стадий заживления ран [204].

Увеличение количества ТК, вероятно, связано с увеличением уровня экспрессии моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) и последующей секрецией TGF- β , хемоаттрактанта тучных клеток. ТК также высвобождают воспалительные медиаторы (гистамин, VEGF, IL-6, IL-8 и TNF- α), которые способствуют проницаемости эндотелия, тем самым облегчая миграцию моноцитов и нейтрофилов к поражению. Выделение лейкотриенов, протеаз и цитокинов тучными клетками связано с продукцией хемотаксических сигналов

для различных типов гранулоцитов, в то время как высвобождение триптазы и катепсина G играет важную роль во взаимодействиях эндотелия и лейкоцитов. Если ангиогенез связан с секрецией TGF- β , то VEGF, химаза, триптаза и гепарин (секретируемые ТК) могут ингибировать ангиогенез, взаимодействуя с ингибирующими проангиогенными факторами.

При раневом поражении нейтрофилы являются воспалительными клетками, которые первыми реагируют на медиаторы, высвобождаемые тромбоцитами и каскадом коагуляции. Привлекаясь к месту ранения, они служат первой линией защиты от инфекции, фагоцитируя и убивая бактерии, а также удаляя инородные материалы и омертвевшие ткани. После поражения кожи нейтрофилы инфильтруют рану в течение часа. Мощный хемоаттрактантный сигнал связан, в первую очередь, с молекулами DAMP, выделяемыми некротическими клетками, TGF- β , C3a, C5a и перекисью водорода, выделяемыми тромбоцитами. DAMP действуют непосредственно на нейтрофилы, прикрепляясь к паттерн-распознающим рецепторам, таким как Toll-подобный рецептор, или способствуя выработке хемоаттрактантов в других клетках. Нейтрофилы также продуцируют воспалительные медиаторы, такие как TNF- α , IL-1 β , IL-6 и CXCL8, которые дополнительно привлекают фибробласты и активируют эпителиальные клетки. После миграции нейтрофилов в место ранения, они генерируют свободные радикалы кислорода и протеазы (нейтрофильную эластазу и нейтрофильную коллагеназу), что способствует удалению компонентов внеклеточного матрикса, образовавшихся при повреждении кожных покровов. Присутствие бактерий в ране может способствовать хронизации раневого поражения за счет перманентного привлечения нейтрофилов и высвобождения ими протеаз, цитокинов и активных форм кислорода. В норме при заживлении раны степень инфильтрации раны нейтрофилами уменьшается в течение 2–3 дней, чему способствует апоптоз и тканевые моноциты.

Ещё одним типом иммунных клеток, участвующих в заживлении раневого поражения, являются макрофаги. Они начинают инфильтрировать рану через 48

часов после поражения. Также возможна инфильтрация раны моноцитами с их последующей дифференцировкой. Активация макрофагов приводит к образованию двух подтипов данных клеток, называемых M1 и M2. Фенотип макрофагов M1 является провоспалительным и опосредован лигандами TLR4 и IFN- γ . Дифференцировка клеток в фенотип M2 опосредует переход от воспалительной фазы к пролиферативной фазе заживления и обусловлен IL-4 и/или IL-13. M2 макрофаги выделяют широкий спектр факторов роста и цитокинов, включая PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF, IGF-1, TNF- α , IL-1 и IL-6. Медиаторов привлекают и активируют фибробласты, которые отвечают за формирование тканевого матрикса в месте заживления, и способствуют ангиогенезу [294]. Отсутствие нейтрофилов и уменьшение количества макрофагов в ране является признаком того, что воспалительная фаза приближается к концу и начинается пролиферативная фаза.

Дендритные клетки также вносят значительный вклад в регенерацию тканей. Клеточные взаимодействия между ДК и ТК необходимы для секреции факторов, таких как TGF- β или TNF- α , которые ответственны за дифференцировку клеток-предшественников в ДК. ДК редко встречаются в ранах возрастом менее 1 дня, тогда как накопление клеток этого типа наблюдается в ранах возрастом от 3 до 14 дней. В популяции дендритных клеток в эпидермисе человека присутствует субпопуляция клеток, экспрессирующих CD1a и CD207/лангерин, которые являются так называемыми клетками Лангерганса. Исследования показали, что эти типы клеток быстро увеличиваются в количестве в течение первого часа после травмы. В подтверждение этих гипотез было доказано, что при моделировании раневого поражения на мышцах полное заживление раны не происходило в случаях дефицита ДК. Следовательно, они вмешиваются в начальную фазу заживления ран, секретируя факторы, которые запускают пролиферацию клеток, участвующих в этом явлении [119].

Отдельный фенотип ДК – это плазмоцитоидные дендритные клетки, которые продуцируют большое количество IFN I типа и экспрессируют TLR7 и

TLR9. Хотя плазмцитоподобные дендритные клетки отсутствуют в коже в норме, они быстро рекрутируются при травме.

При ранении лимфоциты мигрируют в зону поражения через 72 часа после травмы. Важным хемотактантом лимфоцитов в место ранения является IL-1 макрофагального происхождения, который также участвует в ремоделировании внеклеточного матрикса. Лимфоциты активируются IFN- γ и TNF- α , а также антигенпрезентирующими клетками. Оказавшись внутри места поражения, лимфоциты также продуцируют различные хемокины: в первую очередь MCP-1, а через 4 дня IP10 (CXCL10), MIG (CXCL9) и MDC (CCL22) [60, 270]. Лимфоциты также секретируют факторы роста, такие как EGF и FGF-b, способствующие заживлению [200].

1.4.1.3 Пролиферативная фаза

В пролиферативной фазе заживления раны фибробласты, помимо участия в формировании грануляционной ткани, участвуют в регуляции миграции кератиноцитов. Во время пролиферативной активности фибробласты посредством высвобождения VEGF, FGF, ангиопоэтина 1 (ANG1) или тромбоспондина (TSP) способствуют васкуляризации. Недавние исследования показывают, что на этой стадии фибробласты являются мишенями хемокинов, таких как MCP-1, которые усиливают проявление MMP1 и TIMP1 в этих клетках [294]. Синтез внеклеточного матрикса фибробластами поддерживает реэпителизацию, также стимулируя миофибробласты [77].

Из-за морфофункциональных изменений кератиноциты мигрируют к поврежденной области в течение 24 часов. Процесс, характеризующийся отсоединением от подлежащей базальной мембраны, облегчается MMP1, который экспрессируется на высоком уровне на краях раны. Мигрирующие базальные кератиноциты экспрессируют CD44, в отличие от покоящихся базальных клеток [10, 35, 111]. Миграция и пролиферация кератиноцитов стимулируется IL-8 [221].

Во время заживления ран кератиноциты модулируют активность фибробластов, стимулируя их пролиферацию и секрецию факторов роста. После

распознавания молекулярных паттернов PAMPs и DAMPs, кератиноциты определяют активацию провоспалительных сигнальных путей посредством продукции интерлейкинов (например, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 или IL-20), TNF- α и хемокинов. Наконец, кератиноциты могут модулировать дифференциацию фибробластов в миофибробласты в зависимости от тонко настроенного баланса между провоспалительной средой или средой с преобладанием TGF- β [10, 103]. Продолжительность фазы пролиферации составляет 3–12 дней [60].

1.4.1.4 Ремоделирование

Основными процессами, отличающими фазу созревания (или ремоделирования) заживления раны, являются восстановление уровня коллагена в ткани и сокращение размеров раны.

Изменения в типе, количестве и организации коллагена увеличивают прочность эпителизированной раны на разрыв. Первоначально синтезируемый в больших количествах коллаген типа III затем заменяется коллагеном типа I (доминирующим фибриллярным коллагеном в коже). Прочность на разрыв недавно эпителизированной раны составляет всего около 25 % от нормальной ткани. Восстановленные в результате заживления ткани не достигают механических характеристик исходных неповрежденных тканей. Прочность ткани на растяжение повышается в первую очередь за счет реорганизации коллагеновых волокон и увеличения ковалентного сшивания молекул коллагена ферментом лизилоксидазой, который секретируется фибробластами. В течение нескольких месяцев или более изменения в организации коллагена в восстановленной ткани будут медленно увеличивать прочность на растяжение до максимума - около 80 % от нормальной ткани.

Сокращение грануляционной ткани, образованной после травмы, стимулируется миофибробластическими клетками, которые дифференцируются из фибробластов *in situ*. Миофибробласты регулируют сокращение размеров раны и ремоделирование повреждённой ткани, принимая сократительный фенотип

(благодаря присутствию актина) и высвобождая молекулы внеклеточного матрикса. Впоследствии, после восстановления целостности ткани, происходит естественное снижение активности миофибробластов, и часть их популяции устраняется из-за апоптотических явлений. Тем не менее, принципы модуляции сигнальных путей, инициирующих эти процессы, изучены не до конца. [77, 183].

1.5 Подходы к терапии воспалительных заболеваний

Наиболее распространенные терапевтические подходы к лечению острых воспалительных заболеваний включают в себя купирование болевого синдрома, подавление инфекции с помощью антибиотиков, стероидную и нестероидную противовоспалительные терапии [13, 15]. Данные подходы имеют ряд ограничений, в том числе повышенный риск развития лекарственной устойчивости у бактериальных штаммов при длительном неудачном использовании антибиотиков, а также системный способ доставки противовоспалительных препаратов, что сопряжено с возникновением тяжелых побочных эффектов [15, 48]. В качестве альтернативы активно изучаются более специфические подходы к терапии воспалительных заболеваний, в частности – терапия стволовыми клетками.

Терапия стволовыми клетками обычно предполагает трансплантацию аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, жировой ткани, зубной пульпы или ткани пуповины. После имплантации мезенхимальные стволовые клетки секретируют иммуноподавляющие цитокины (IL-10 и TGF- β) для стимуляции продукции регуляторных Т-клеток (Treg) и ингибирования дифференциации Т-хелперов 1 и 2 типов [133]. Несколько клинических испытаний с использованием мезенхимальных стволовых клеток показали многообещающие результаты в улучшении симптомов воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз и острый респираторный дистресс-синдром [284].

Несмотря на многообещающие результаты, терапия стволовыми клетками имеет внутренние ограничения: выделение мезенхимальных стволовых клеток из

организма донора занимает много времени, что делает их непригодными для крупномасштабного производства. Данная терапия также требует большого количества жизнеспособных клеток (10 миллионов на дозу, при этом требуется несколько доз), что может усложнить практику аутологичной трансплантации [220].

Другим успешным подходом к терапии воспалительных заболеваний является применение ингибиторов цитокинов. Ингибиторы цитокинов доказали противовоспалительную активность в клинических испытаниях; например, анти-TNF антитела при лечении ревматоидного артрита [52]. Антитела могут быть использованы для целенаправленной блокировки сосудов с целью препятствования трансмиграции иммунных клеток, что предотвратит развитие воспалительной активации ввиду отсутствия эффекторных клеток в месте воспаления [168]. В то же время цитокин-таргетная терапия не обладает специфичностью [223], а снижение кроветворения является одним из наиболее распространенных побочных эффектов медикаментозного вмешательства в структуру эндотелия сосудов, что в конечном итоге приводит к возрастанию риска развития инфекций из-за снижения популяции лейкоцитов [223].

Альтернативный терапевтический подход при воспалительных заболеваниях предполагает селективное подавление активности иммунокомпетентных клеток. Блокирование рецепторов компонентов комплемента (C5aR) [126], рецепторов цитокинов (таких как IL-1R и IL-6R) [223], рецепторов активации В-клеток (CD20) [216] и рецепторов адгезии (PSGL1, интегрин $\alpha 4\beta 7$, интегрин $\alpha E\beta 7$ и VLA4) [168] на поверхности иммунных клеток может селективно ингибировать воспалительную активацию. Однако избирательное блокирование эффекторных клеток может привести к системным последствиям из-за избыточности каскада иммунитета [88].

Таким образом, наличие тяжелых побочных эффектов у существующих противовоспалительных препаратов, а также недостатки новых разрабатываемых подходов к противовоспалительной терапии инициируют поиск и разработку

новых нетоксичных и легко масштабируемых соединений с противовоспалительной активностью. Одним из таких соединений может стать фуллерен C₆₀, находящийся в форме водной дисперсии.

1.6 Фуллерен C₆₀ как компонент комплексов с катионными антимикробными пептидами

Перспективным направлением в разработке методов терапии воспалительных заболеваний и раневых повреждений кожи является применение наноразмерных частиц. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженной антимикробной активности металлосодержащих наночастиц (Ag, Au, ZnO), что обосновывает их использование в качестве активных компонентов современных раневых покрытий [212]. Помимо антибактериального эффекта, установлено, что наночастицы модулируют процессы тканевой репарации посредством усиления клеточной адгезии, активации пролиферативных механизмов и регуляции дифференциации клеток.

В контексте стимуляции ангиогенеза заслуживают внимания углеродные наноматериалы (фуллерены, графеновые структуры, углеродные нанотрубки и наноалмазы). В настоящей работе в качестве компонента для создания комбинированных соединений с катионными антимикробными пептидами был выбран фуллерен C₆₀. Данная молекула была выбрана не только в качестве молекулы-транспортера, но и в качестве самостоятельного биологически-активного агента.

1.6.1 Определение фуллерена и структурные особенности

Фуллерены представляют собой отдельный класс аллотропов углерода и привлекли значительное внимание научного сообщества благодаря своим свойствам и потенциалу применения в различных областях, включая материаловедение, химию и медицину. Атомы фуллеренов располагаются в вершинах правильных шести- и пятиугольников, покрывающих поверхность сферы или сфероида, и такие молекулы могут содержать 28, 32, 50, 60, 70, 76 и т. д. атомов углерода. Основное отличие молекул данной группы от большинства

других органических соединений связано с наличием замкнутой полости внутри атомной решетки, в результате чего возможно получение двух типов производных фуллеренов: эктоэдральных (заместители расположены на внешней поверхности молекулы) и эндоэдральных (заместители расположены во внутренней полости) [14].

Структура замкнутой поверхности фуллеренов сопряжена с развитой системой π -электронов, придающих молекуле полярные свойства. Включение даже одного заместителя в фуллереновое ядро приводит к значительным изменениям в строении молекулы, меняя свойства сразу двух атомов углерода (вызывая смену состояния гибридизации из sp^2 в sp^3), вследствие чего единая π -электронная система молекулы нарушается [31].

Наиболее стабильным и распространенным фуллереном является бакминстерфуллерен C₆₀, названный в честь архитектора Бакминстера Фуллера, который изобрел геодезические купола, напоминающие молекулу C₆₀. Фуллерен C₆₀ имеет сфероидальную структуру, в которой атомы углерода расположены в вершинах 12 пятиугольников и 20 шестиугольников. Атомы углерода, образующие сферу, связаны между собой сильной ковалентной связью. Толщина сферической оболочки составляет 0,1 нм, радиус молекулы C₆₀ – 0,357 нм. Длина связи C—C в пятиугольнике составляет 0,14 нм, в шестиугольнике – 0,139 нм [6]. Фуллерен C₆₀ практически нерастворим в воде, ацетоне, этаноле, тетрагидрофуране и других полярных растворителях, но в хлорбензоле, о-дихлорбензоле, бензоле и толуоле хорошо растворяется с образованием окрашенных в красно-фиолетовый цвет растворов [229].

1.6.2 Свойства фуллерена C₆₀

Поскольку бакминстерфуллерен стал объектом интенсивных исследований в области биологии и медицины, оценка его безопасности стала также актуальной задачей. В научной литературе неоднократно высказывались предположения о потенциальной токсичности нативного фуллерена C₆₀ [202], однако позже были признаны методологические недостатки первых экспериментов, а именно наличие

достаточно большой концентрации тетрагидрофурана в образцах [201], что привело к ложному выводу о токсичности фуллерена. Напротив, согласно некоторым исследованиям [101], кристаллическая форма C₆₀, а именно пленки фуллерена плотностью 10, 20, 30 мкг/см², не оказывали токсического действия на культуры клеток линии МА-104 (эпителий почки зеленой мартышки) без интенсивного освещения, проявляя при этом мощный фототоксический эффект при облучении галогеновой лампой. Водорастворимый комплекс C₆₀/ПВП (поливинилпирролидон) не только оказался нетоксичным, но и ослаблял вредное действие самого ПВП [268]. Авторы последнего исследования пришли к выводу, что проявление токсического действия фуллерена зависит от способа его растворения, используемых поверхностно-активных веществ и/или модификаторов, степени дисперсности в растворе и условий биологического эксперимента, в частности, был обнаружен прооксидантный эффект под действием УФ-света и антиоксидантный — без УФ-освещения.

Современные исследования выявили широкий спектр биологической активности фуллерена C₆₀ и его производных, в том числе антиоксидантную [174, 307], противовирусную [146, 174, 209] и противовоспалительную активности [129]. Ранее на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России была разработана уникальная технология получения стабильной водной дисперсии фуллерена C₆₀, что позволило провести исследования его биологической активности [245]. Было показано, что водная дисперсия фуллерена C₆₀ может быть использована при терапии воспалительных заболеваний, в частности аллергопатологий. Так, использование эмульсионной мази, содержащей ВРФ, подавляло развитие воспаления в мышинной модели атопического дерматита [243]. Схожим образом, исследование, проведенное на модели ранозаживления, показало увеличение уровня экспрессии некоторых генов, участвующих в процессе репарации эпителиальной ткани [245]. Выявлено, что производные фуллерена C₆₀ оказывают иммуномодулирующее действие на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), снижая продукцию цитокинов

(IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-5) и ослабляя патологию [2]. На ТК кожи и легких человека было продемонстрировано, что введение фуллерена C60 способно увеличивать выработку провоспалительных цитокинов (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12 и IFN- γ) в бронхоальвеолярном лаваже [230].

Также многими экспериментами на крысах было продемонстрировано, что фуллерен C60 не проявляет хронической токсичности при пероральном и внутрибрюшинном путях введения [33].

Таким образом, с момента первых экспериментов по исследованию биологической активности фуллеренов было достигнуто много успехов. В настоящее время разработка конъюгатов и комплексов на основе фуллеренов стала основной стратегией в преодолении присущих молекулам данного класса гидрофобных препятствий с целью использования их в биологических целях. Таким образом, существенным вкладом как в фундаментальную науку, так и в практическое здравоохранение, явилось бы создание эффективных препаратов, сочетающих несколько биологических активностей, например, противовоспалительную и ранозаживляющую активность фуллерена C60 и бактерицидную активность антибактериального агента.

Фуллерен C60 был выбран как биологически активная молекула, обладающая антиоксидантной активностью, способная подавлять и неаллергическое, и аллергическое воспаление, использование которой способствует ускорению процесса заживления ран и предотвращает образование рубцовой ткани. В качестве антибактериального агента было принято решение использовать синтетические антимикробные пептиды (АМП). АМП были выбраны как альтернативные антибактериальные соединения, развитие резистентности к которым происходит существенно реже, чем к классическим антибиотикам. Полученные комбинированные соединения могли бы стать основой препаратов для комплексной терапии воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией, в частности раневых инфекций.

1.7 Антимикробные пептиды: классификация и механизмы действия

Антимикробные пептиды — гетерогенный класс низкомолекулярных пептидов, обладающих ингибирующей активностью в отношении микроорганизмов [222]. В настоящее время этот термин включает в себя АМП всех организмов (эукариот и прокариот) и путей биосинтеза (рибосомонезависимый, рибосомозависимый, синтетический пути), а АМП высших организмов предпочтительно называют пептидами защиты организма-хозяина (host defense peptides, HDP) [3, 4]. Большинство идентифицированных АМП происходят из животных источников и относятся к гуморальным факторам врожденного иммунитета [167, 281]. АМП вовлечены в реакции врожденного и адаптивного иммунитета, участвуя в модуляции естественных защитных систем хозяина, таких как сопротивление адгезии и колонизации патогенными бактериями [46], а также во взаимодействиях хозяина и микробиома [154]. АМП могут быть обнаружены в различных типах клеток и экспрессируются конститутивно или индуцируемо в ответ на инфекционные или воспалительные стимулы [50].

АМП были открыты в 1939 году, когда микробиолог Рене Дюбо выделил из штамма почвенной бактерии рода *Bacillus* антимикробный агент, грамицидин, который, как было продемонстрировано, защищает мышей от пневмококковой инфекции [283]. Важно отметить, что ранее, в 1922 году, Александр Флеминг идентифицировал лизоцим как типичный АМП ввиду его антибактериальной и антигрибковой активности [191], однако это оспаривается некоторыми авторами, поскольку лизоцим имеет длинную аминокислотную последовательность (148 аминокислотных остатков), что превышает таковую для большинства АМП, и обладает ферментативной активностью [177]. Впоследствии было обнаружено несколько АМП как из прокариотического, так и из эукариотического царств [45, 90], включая тироцидин, вырабатываемый бактериями *Bacillus brevis*, обладающий антибактериальной активностью, и пуротионин, идентифицированный в растении *Triticum aestivum*, активный против грибов и

бактерий [106]. Первым описанным (1956 год) АМП животного происхождения является пептид, выделенный из лейкоцитов кролика [145], который позже будет отнесен к дефензинам. В 1981 году из гемолимфы шелкопряда *Hyalophora cecropia* был выделен и получил описание последовательности первый в истории АМП насекомых цекропин – катионный амфифильный пептид, активный в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий и грибов [47]. В 1985 году были выделены первые антимикробные пептиды человека, которые авторы называли «дефензинами», и, впоследствии, появилось определение «катионный антимикробный пептид» [124, 186, 203]. Было обнаружено, что АМП высококонсервативны среди широкого спектра видов, включая насекомых, нематод, микробов и млекопитающих, и обеспечивают защиту не только от бактерий и грибов, но и других патогенных организмов, в том числе вирусов, архей и паразитов [279]. В отличие от традиционных антибиотиков, АМП активны против различных мишеней и используют несколько механизмов действия, некоторые из которых нацелены на мембрану, а другие сосредоточены на внутриклеточных мишенях, что значительно уменьшает вероятность появления резистентных видов микроорганизмов [175].

АМП обладают огромной вариабельностью и разнообразием структур и последовательностей, однако большинство из них имеют общие характеристики. АМП, как правило, представляют собой небольшие молекулы, число аминокислот которых по разным источникам составляет от 2-10 до 60-100 аминокислотных остатков [250]. В частности, средняя длина всех АМП в Базе данных антимикробных пептидов (APD) составляет 33,19 аминокислот [49]. АМП могут быть заряженными и незаряженными, но подавляющее большинство содержат композицию, богатую катионными и гидрофобными аминокислотами, и обладают катионными и амфифильными характеристиками благодаря тому, что содержат гидрофобные группы и имеют как гидрофобные, так и гидрофильные домены. В свою очередь, большинство катионных антимикробных пептидов (КАМП) представляют собой спиралевидные полипептиды с короткими аминокислотными

последовательностями, включающими избыточные количества положительно заряженных аминокислот лизина (Lys) и аргинина (Arg). В соответствии с широким определением, АМП также могут иметь различные модификации (липидные цепи, цепи ПЭГ, сахара и др.), вследствие чего анионные и нейтральные пептиды и гликопептиды также можно отнести к классу АМП [45]. Одним из примеров анионных антимикробных пептидов является дермцидин [173]. Дермцидин и его производные пептиды высокоэффективны против ряда бактерий и грибов в условиях, имитирующих человеческий пот. Было обнаружено, что дермцидин инактивирует *E. coli*, *S. aureus* и [128] и *Staphylococcus epidermidis*, который является преобладающим грам-положительным микробом на коже человека и основным нозокомиальным патогеном, часто образующим крайне резистентные биопленки на медицинских устройствах, таких как катетеры [73].

Катионные и амфипатические свойства играют важную роль в активности АМП. Катионный заряд пептидов привлекает их к отрицательно заряженным микробным мембранам, в то время как амфифильность позволяет взаимодействовать одновременно с гидрофобным ядром липидной мембраны и полярным окружением, интегрироваться в билипидный слой и разрушать его [121], что впоследствии приводит к утечке содержимого бактериальных клеток и последующей гибели [188]. Такой механизм селективности КАМП по отношению к бактериям обусловлен присутствием анионных липидов, липополисахаридов (у грам-отрицательных бактерий) или тейхоевых кислот (у грам-положительных бактерий), которые формируют отрицательный заряд, несопоставимый с таковым поверхностного слоя мембраны клеток млекопитающих. Механизмы действия АМП на микроорганизмы зависят от различных физико-химических свойств молекул: заряда, структуры, длины последовательности, концентрации пептида, гидрофобности и состава мембраны микроорганизма. Изменчивость механизмов и эффективность АМП против определенных типов бактерий в основном программируется тканью и клеткой-источником пептида [271]. Например, β -

дефензины в кожном покрове проявляют активность против *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* - двух важных патогенов, ответственных за кожные инфекции.

Большинство АМП обладают высокой способностью противостоять кислотности и щелочности, термостабильны и обладают широким спектром антибактериальных функций. В норме они подвержены деградации протеазами в тонком кишечнике хозяина, которые гидролизуют и инактивируют АМП [279].

1.7.1 Классификация антимикробных пептидов

В настоящее время существуют различные способы классификации АМП, но наиболее распространенной и предпочтительной среди них является классификация на основании вторичной (пространственной) структуры.

Большинство пептидов можно классифицировать на основании наличия или отсутствия двух ключевых компонентов вторичной структуры - α -спирали и β -листа (рисунок 2). В соответствии с этим принципом классификации, АМП обычно подразделяются на несколько семейств, три из которых являются основными, встречаются почти во всех публикациях и базах данных АМП и не подвергаются сомнению авторами: линейные амфипатические α -спиральные пептиды (например, кателицидин человека LL-37), β -складчатые пептиды, стабилизированные переменным количеством дисульфидных связей (например, гомезин из гемоцитов паука *Acanthoscurria gomesiana*) и пептиды, обладающие одновременно структурами α -спирали и β -листа (например, α 1-пуротионин).

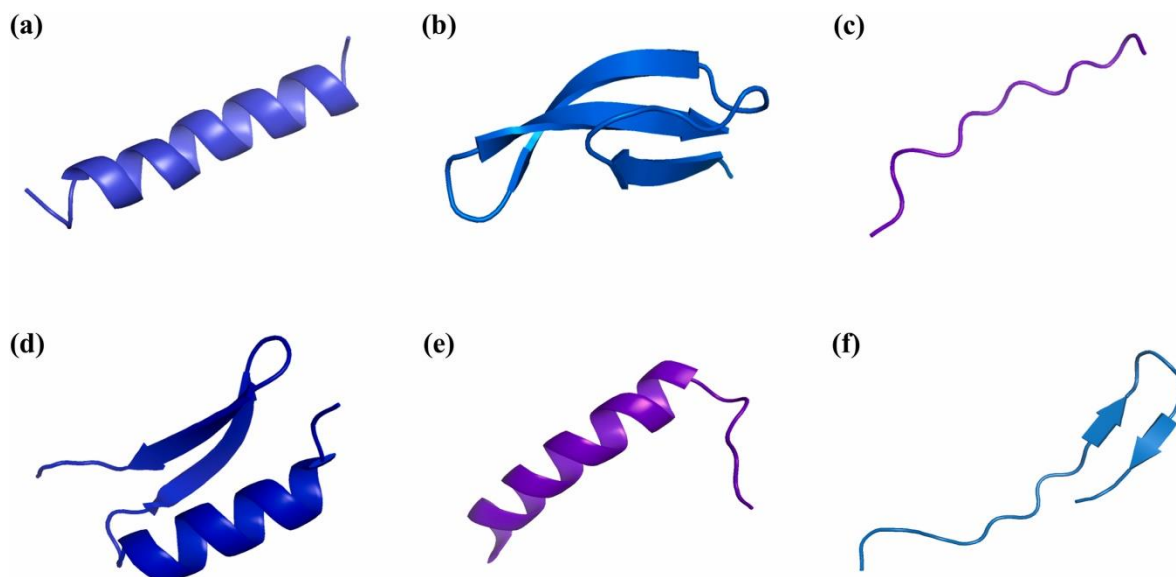


Рисунок 2. Примеры трех структурных типов АМП. (а) α -спиральный пептид, например, магаинин-2 (PDB:2MAG); (b) β -пластинчатый пептид, например, человеческий α -дефензин-6 (PDB:1ZMQ); (c) Удлиненный пептид, например, индолицидин (1G8C). (d) Пептид смешанного типа со структурами α -спирали и β -листа, например, термицин (PDB:1MM0); (e) Пептид смешанного типа - удлиненный пептид со структурой α -спирали, например, лактоферрицин свиньи (PDB:5ID5); (f) Пептид смешанного типа - удлиненный пептид со структурой β -листа, например, танатин (PDB:5XO4) [273]

Многие исследователи выделяют четвертую группу, в которую входят пептиды, не обладающие четко определенной трехмерной структурой, то есть пептиды без α -спирали или β -листа (например, индолицидин) (таблица 1). К этой группе относили большинство пептидов, не входящих в первые три типа, но несколько лет назад заговорили о пятом семействе для топологически сложных АМП [138]. С течением времени появилось больше сообщений о подобных пептидах, в том числе лассо-пептидах и АМП с тиоэфирными мостиковыми структурами [250]. Помимо упомянутых семейств, некоторые авторы и базы данных АМП выделяют дополнительные группы, обособляя, например, пептиды с дисульфидными связями или пептиды, богатые необычными аминокислотами, такими как Gly, Arg и Trp (база данных APD3).

Таблица 1 – Классификация антимикробных пептидов на основе пространственной структуры

Структура пептида	Группа пептидов	Название пептида	Источник получения	Последовательность пептида	Заряд пептида	Ссылка
α-спиральная	ауреины	ауреин 1.2	лягушки <i>Litoria aureus</i> и <i>Litoria raniformis</i>	GLFDIIKKIAESF-NH ₂	+1	[240]
	цитропины	цитропин 1.1	лягушка <i>Litoria citropa</i>	GLFDVIKKVASVIGGL-NH ₂	+2	
	макулатины	макулатин 1.1	лягушки <i>Litoria genimaculata</i> , <i>Litoria eucnemis</i>	GLFGVLAKVAAHVVPAAIEHF-NH ₂	+3	
	кателицидины	LL-37	человек, <i>Homo sapiens</i> ; обыкновенный шимпанзе <i>Pan troglodytes</i>	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRI KDFLRNLVPRTES-NH ₂	+6	[196]
		PMP-36	домашняя свинья, <i>Sus scrofa</i>	VGRFRRLRKKTRKRLKKIGKVL KWIPPVIGSIPLGCG-NH ₂	+13	[306]
	дистинктины	Дистинктин	лягушка <i>Phyllomedusa distincta</i>	NLVSGLEARKYLEQLHRKLKNC KV-NH ₂	+4	[39]
	связывающие липиды сапозиноподобные белки	ценопор-5 (Cp-5)	почвенная нематода, <i>Caenorhabditis elegans</i>	RSALSCQMCELVVKKYEGSADK DANVIKKDFDAECKKLFHTIPFG TREC DHYVNSKVDPIIHELEGGT APKDVCTKLNECP-NH ₂	+1	[176]
	цекропины	цекропин А (CecA)	гигантский шелкопряд, <i>Hyalophora cecropia</i>	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAG PAVAVVGQATQIAK-NH ₂	+7	[58]
β-складчатая	θ-дефензины	RTD-1	лейкоциты, макак-резус, <i>Macaca mulatta</i>	GFCRCLCRRGVCRCICTR-NH ₂	+5	[40, 265]
	α-дефензины млекопитающих	α -дефензин 1 (нейтрофильный пептид-1 человека; HNP-1)	человек, <i>Homo sapiens</i>	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQG RLWAFCC-NH ₂	+3	[280]
	β-дефензины птиц	галлинацин 12	домашняя курица, <i>Gallus gallus</i>	DTVACRIQGNFCRAGACPPTFTIS GQCHGGLLNCCAKIPAQ-NH ₂	+2	[123]
	АМП растений	NCR169	симбиотические бактерии, люцерна усечённая <i>Medicago truncatula</i>	EDIGHIKYCGIVDDCYKSKKPLF KIWKCVENVCVLWYK-NH ₂	+3	[130]
	АМП насекомых	танатин*	клоп <i>Podisus maculiventris</i>	GSKKPVPPIYCNRRGTGKCQRM-NH ₂	+6	[87]

Продолжение таблицы 1

Структура пептида	Группа пептидов	Название пептида	Источник получения	Последовательность пептида	Заряд пептида	Ссылка
β-складчатая	АМП членистоногих	полифемузин I	мечехвост <i>Limulus polyphemus</i>	RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH ₂	+8	[301]
	оводефензины, дефензиноподобные пептиды морской черепахи	TEWP	головастая морская черепаха <i>Caretta caretta</i>	QKKCPGRCTLKCGKHERPTLPY NCGKYICCVPVKVK-NH ₂	+8	[67]
Наличие α-спирали и β-листа	дефензины грибов	Плектазин	гриб <i>Pseudoplectania nigrella</i>	GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSI KGYKGGGYCAKGGFVCKCY-NH ₂	+3	[189]
	дефензины моллюсков	MGD-1	черноморская мидия, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRCG GYCGGWHRLPCTCYRCG-NH ₂	+8	[238]
	β-дефензины	человеческий β-дефензин 1 (hBD-1)	человек, <i>Homo sapiens</i>	DHYNCSVSSGGQCLYSACPFTKI QGTCYRGKAKCK-NH ₂	+4	[218]
	дефензины моллюсков	Cg-Defh1	устрица <i>Crassostrea gigas</i>	GFGCPRDQYKCNSHCQSIGCRA GYCDAVTLWLRTCTDCNGKK- NH ₂	+4	[113]
	ядоподобные бета-дефензины, «промежуточные» дефензиноподобные пептиды	Int-DLP	утконос <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	RRRRRRPPCEDVNGQCQPRGNP CLRLRGACPRGSRCCMPTVAAN- NH ₂	+10	[264]
	аналоги бета-дефенинов млекопитающих	hBDconsensus	синтетический	KKCWNGGRCRKKCKENEKPIGY CRNGKKCCVN-NH ₂	+9	[225]
	дефензины кукурузы	ZmD32	кукуруза сахарная <i>Zea mays</i>	RTCQSQSHRFRGPCLRRSNCANV CRTEGFPGGRCRGFRRRCFCTTH C-NH ₂	+12	[142]
Без α-спирали и β-листа	кателицидины, пептиды, богатые Trp	Индолицидин	домашний бык, <i>Bos taurus</i>	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	+4	[38, 51]
	пептиды, богатые Gly, АМП млекопитающих	KAMP-19	человек, <i>Homo sapiens</i>	RAIGGGLSSVGGGSSTIKY-NH ₂	+2	[260]
	бактериоцины класса 1	эпиланцин 15X	эпидермальный стафилококк <i>Staphylococcus epidermidis</i> 15X154	SASIVKTTIKASKKLCRGFTLTG CHFTGKK-NH ₂	+8	[285]

Продолжение таблицы 1

Структура пептида	Группа пептидов	Название пептида	Источник получения	Последовательность пептида	Заряд пептида	Ссылка
Без α -спирали и β -листа	θ -дефензины, кольцевые АМП	RTD-3	макак-резус, <i>Macaca mulatta</i>	GFCRCICTRGFCRCICTR-NH ₂	+4	[265]
	бактериоцины	плантарицин ASM1	лактобактерии <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	KPAWCWYTLAMCGAGYDSGTC DYMYSHCFGVKHSSGGGGSYHC -NH ₂	+3	[122]
	гликопептиды	диптерицин дрозофилы	дрозофила обыкновенная <i>Drosophila melanogaster</i>	DDMTMKPTPPPQYPLNLQGGGG GGSGDGFGFAVQGHQKVWTS NGRHEIGLNGGYGQHLGGPYGN SEPSWKVGSTYTYRFPNF-NH ₂	+2	[242]
	липопептиды, нерибосомальные пептиды	тридекаптин A1	палочковидные бактерии <i>Paenibacillus terrae</i>	VKGSWSKKFEVIA-NH ₂	+2	[164]

1.7.2 Механизмы действия антимикробных пептидов

Механизмы действия АМП можно разделить на два основных направления: прямое антимикробное действие и иммуномодуляция. Механизм действия прямого киллинга можно также разделить на два вида: мембранное нацеливание и немембранное нацеливание.

Большинство АМП взаимодействуют с мембраной клетки, не связываясь с рецепторами, вследствие принципиального различия в структурах мембран бактериальной и эукариотической клетки. Внешний монослой бактериальной мембраны состоит в основном из липидов с отрицательно заряженными головными группами, такими как фосфатидилглицерин и кардиолипин [1], тогда как внешний слой бислой мембраны животных клеток состоит из цвиттерионных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин, сфингомиелин и другие нейтральные компоненты, такие как холестерин. Большинство липидов мембраны эукариотической клетки с отрицательно заряженными головными группами находятся во внутреннем слое мембраны, обращенном к цитоплазме. Следовательно, положительно заряженный АМП способен вступать в электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами бактериальной мембраны.

Механизмы действия мембранного нацеливания можно разделить на две категории: модели, описывающие образование трансмембранных пор, и модели без пор. Существует четыре общепризнанных механизма действия, которые описывают мембранную активность АМП: модель «бочка» («barrel-stave model»), модель «ковёр» («carpet model»), модель агрегата/кластера (мицеллизация/детергент-подобный механизм («detergent-like mechanism»)) и модель тороидальных пор («toroidal pore») [297].

В модели тороидальных пор пептиды вначале связываются с мембраной, а затем агрегируют, вызывая образование складок липидов бислоя мембраны. Это приводит к формированию трансмембранного канала, выстланного несколькими пептидными единицами, причем пептид тесно связан с липидными головными

группами мембранных фосфолипидов [18]. Модель «ковёр» предполагает, что накопление пептидов на внешней мембране запускает образование в ней локального утончения, что приводит к постепенному разрушению структуры мембраны и проникновению пептидов [91].

Модель «бочка» отличается тем, что пептиды выстраиваются параллельно фосфолипидам мембраны, образуя трансмембранный канал, выстланный гидрофильной стороной пептидов, обращенной внутрь, и гидрофобной стороной, обращенной наружу, взаимодействующей с липидным ядром бислоя [295].

В модели агрегата/кластера (мицеллизация) пептиды агрегируют на поверхности мембраны, образуя неспецифические кластеры или мицеллоподобные структуры. Эти агрегаты разрушают мембрану, вызывая локальные нарушения бислоя, которые приводят к истончению мембраны, и, как следствие, её искривлению и в конечном итоге лизису клеток.

Помимо способности деградации клеточных мембран, исследования показывают, что АМП также могут влиять на жизнеспособность бактерий через внутриклеточные механизмы действия [120], например, ингибировать ключевые ферменты, участвующие в различных важных бактериальных функциях, таких как сворачивание белка, деление клеток, синтез клеточной стенки, транспорт ионов и другие жизненно важные метаболические процессы [114].

1.7.3 Недостатки антимикробных пептидов

Несмотря на хорошие перспективы применения АМП в клинической практике, выделяют несколько недостатков молекул данного класса, препятствующих использованию препаратов на их основе в медицинской практике.

Проблема масштабирования процесса наработки пептидов. Несмотря на то, что АМП широко распространены в природе, процессы экстракции и очистки сложны и ограничены, связаны с низким выходом, сложной технологией выделения и высокой стоимостью экстракции. Получение АМП с помощью методов биологической экстракции не позволяет получить достаточное

количество для удовлетворения потребностей коммерческого применения, а искусственный синтез с использованием химических методов признан дорогостоящим [173]. Также, при биологической экспрессии АМП с помощью технологии генной инженерии трудно получить целевой продукт и высокую эффективность экспрессии.

Нестабильность пептидных молекул. Стабильность АМП как препаратов вызывает большую озабоченность, поскольку многие из них имеют короткий период полураспада [170]. Касательно местного применения, АМП подвержены разрушению под воздействием окружающей среды (гидролиз, окисление, фотолиз) и факторов, характерных для области раневого поражения (щелочной pH, протеолиз). В отношении системного применения, то быстрая протеолитическая деградация в крови, повышенный печеночный и почечный клиренс и чувствительность к физиологическим концентрациям соли, короткий период полураспада в конечном итоге ограничивают эффективное применение АМП [234]. Кроме того, низкие уровни проникновения в клетки слизистой оболочки кишечника снижает возможность перорального введения АМП [95].

Низкая антибактериальная активность при использовании внутрь. Несмотря на то, что большинство АМП проявляют высокую активность *in vitro*, антибактериальная активность *in vivo* может быть снижена из-за разнообразия микроокружения, например, воздействия протеаз и изменений значений pH [263]. Например, в статье Niemeyer-van der Kolk описан синтетический аналог индолицидина - омиганан, который исследовался для лечения атопического дерматита средней степени тяжести, не смог улучшить клинические симптомы у пациентов, хотя проявлял активность в отношении *S. aureus* и приводил к дисбиозу [198], а чувствительные к сыворотке крови АМП, такие как LL-37, могут терять антибактериальную активность, связываясь с белками сыворотки.

Токсичность для организма-хозяина. Другим фактором, препятствующим использованию АМП в клинической практике, является их потенциальная токсичность для клеток млекопитающих.

В соответствии с механизмом действия, АМП с явным токсическим действием можно разделить на рецепторсвязывающие пептиды и мембраноактивные пептиды [69]. Первые оказывают бактериостатическое действие путем модуляции иммунной системы, и повышение их концентрации в организме может спровоцировать возникновение нецелевых побочных эффектов и развитие хронических воспалительных заболеваний, таких как атопический дерматит, розацеа, псориаз и гнойный гидраденит [258]. В свою очередь, мембраноактивные пептиды, например порообразующие АМП (аламетицин, мелиттин и др.), обладают гемолитическими и цитотоксическими свойствами [217].

Эволюция резистентности к антимикробным пептидам. По сравнению с традиционными антибиотиками, вероятность развития устойчивости к АМП довольно низкая, однако существует [299]. Например, испытание на модельном насекомом *Tenebrio* показало, что некоторые устойчивые к АМП *S. aureus* лучше выживают в организме хозяина, что подтверждает возможность возникновения потенциальной перекрестной резистентности к эндогенным АМП хозяина вследствие развившейся резистентности к экзогенным АМП [100]. Более 10 АМП человеческого происхождения, проходящих в настоящее время клинические испытания [154], могут вызывать перекрестную резистентность в отношении эндогенных мишеней.

1.8 Комбинированные соединения на основе антимикробных пептидов

Упомянутые недостатки нативных и синтетических пептидных молекул, препятствующие широкому применению АМП в клинической практике, повышают необходимость применения новых технологий, направленных на увеличение терапевтического потенциала перспективных молекул. Среди них особое внимание заслуживает стратегии молекулярной модификации АМП, в частности, конъюгация и образование комплексов с другими биологически активными молекулами.

1.8.1 Комплексы антимикробных пептидов с наночастицами

Наноструктуры – агенты, потенциально обладающие способностью к модуляции фармакокинетики и фармакодинамики препаратов, в том числе АМП [96], защите от сывороточных протеаз и биodeградации, повышению химической стабильности, сохранению активности препарата и минимизации побочных эффектов [288]. Использование конъюгатов наночастицы-АМП как носителей лекарственных средств также привлекает внимание исследователей ввиду большой адсорбционной поверхности наночастиц для присоединения пептидов, а также способности наночастиц предотвращать самоагрегацию АМП. Как потенциальные молекулы-транспортеры, наночастицы должны характеризоваться отсутствием цитотоксичности и иммуногенности; то есть терапия, основанная на таких конъюгатах, может способствовать стабилизации и эффективности АМП, а также снижению их токсичности из-за улучшенного транспорта молекул через мембрану клетки.

1.8.1.1 Комплексы антимикробных пептидов с металлическими наночастицами

Металлические наночастицы, такие как золото и серебро, обладают антимикробными свойствами, и поэтому при их сочетании с АМП можно использовать более низкие дозы полученного препарата для снижения токсичности в отношении клеток млекопитающих. Casciaro с коллегами предложили конъюгацию линейных антибактериальных пептидов эскулентина-1a и Esc с наночастицами золота. В частности, Esc, обнаруженный в коже лягушки, обладал активностью против *P. aeruginosa*. Комплекс наночастицы золота–Esc демонстрировал 15-кратное увеличение активности по сравнению с чистым пептидом без токсичности в отношении кератиноцитов человека (*in vitro*), а также способствуя реэпителизации и увеличивая биодоступность [62].

1.8.1.2 Комплексы антимикробных пептидов с углеродными нанотрубками

Углеродные нанотрубки относятся к семейству фуллеренов и являются перспективными агентами для доставки лекарств благодаря их внутренней стабильности, структурной гибкости и поверхностной функционализации [247], однако обеспечивают острый и хронический токсический эффект.

Например, конъюгат индолицидина с углеродными нанотрубками способен вызывать экспрессию провоспалительных генов врожденной иммунной системы, а также проявлять антибактериальную активность в концентрации в 1000 раз ниже по сравнению со свободным индолицидином [256]. Недавно Pradhan с соавторами конъюгировали LL-37 и индолицидин с короткими многослойными углеродными нанотрубками. Иммунорегуляторная активность наноконъюгатов *in vitro* была значительно выше, чем у диссоциированных форм индолицидина и LL-37, а пептидная активность сохранялась даже при концентрации, которая в 1000 раз ниже ($0,02 \text{ мкг/мл}^{-1}$ для наноконъюгатов и 20 мкг/мл^{-1} для свободных пептидов) [214].

1.9 Резюме

Воспаление, эволюционно сформировавшееся как защитный механизм организма в ответ на патогенные стимулы или повреждение тканей, при потере регуляции трансформируется в системный патологический процесс. Чрезмерная активация провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 и IFN- γ , может привести к развитию цитокинового шторма — каскадной реакции, характеризующейся массивной инфильтрацией нейтрофилов, повреждением эндотелия сосудов и последующей полиорганной дисфункцией. Данный процесс лежит в основе критических состояний, таких как сепсис (11 млн смертей ежегодно) и септический шок (летальность $\approx 40\%$).

Нарушение процессов регенерации дефектов кожи также представляет собой актуальную клиническую проблему, требующую разработки новых терапевтических стратегий. При хронизации раневого процесса наблюдается персистенция повышенного уровня провоспалительных медиаторов, приводящая

к фибротической трансформации тканей и формированию трофических язв. Центральное значение в регуляции репаративных процессов имеют факторы роста PDGF, TGF- β / α , FGF, IGF-1 и провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1, IL-6, дисрегуляция которых приводит к деструктивным изменениям.

Ключевой проблемой современной терапии остается ограниченная эффективность существующих противовоспалительных препаратов, которые зачастую обеспечивают лишь симптоматическое лечение, а также могут сопровождаться тяжелыми побочными эффектами. Перспективным направлением в разработке новых терапевтических агентов является использование фуллерена C60 — аллотропной формы углерода, демонстрирующей уникальные физико-химические и биологические свойства. Экспериментально подтверждена его способность модулировать иммунный ответ: известно, что в модели гиперчувствительности замедленного типа терапия производными фуллерена C60 приводила к подавлению синтеза провоспалительных цитокинов (IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-5) и ослаблению патологии.

Отдельную проблему представляет собой глобальный рост антибиотикорезистентности, ставящий под угрозу многие достижения современной хирургии. В этом контексте антимикробные пептиды, обладающие амфипатическими и катионными свойствами, рассматриваются как альтернатива традиционным антибиотикам. Их механизм действия основан на электростатическом взаимодействии с отрицательно заряженными мембранами бактериальных патогенов, что минимизирует риск развития резистентности. Однако клиническое применение нативных АМП ограничено низкой стабильностью *in vivo*, склонностью к самоагрегации и потенциальной цитотоксичностью.

Для преодоления этих ограничений разрабатываются стратегии получения конъюгатов и комплексов пептидов с наночастицами, такими как фуллерен C60. Наночастицы способны стабилизировать структуру пептидов, предотвращая их протеолиз и агрегацию, обеспечить таргетный транспорт молекул к очагам

воспаления или инфекции, а также снизить системную токсичность АМП. Таким образом, создание новых комбинированных соединений с расширенным спектром биологической активности на основе катионных антимикробных пептидов и фуллерена C₆₀ стало бы значимым достижением в контексте фундаментальной биомедицины и клинической практики.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Реагенты и растворители

В ходе работы использовали следующие реагенты и растворители: L-аминокислоты (Fluka), N,O-бис(триметилсилил)ацетамид (BTSA, Fluka), диизопропилкарбодиимид (DIC), диметилформамид (DMF, Merck), диметилсульфоксид (DMSO, Merck), 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc), гексаметилдисилоксан (HMDSO), N-гидроксибензотриазол (HOBT), 3-малеимидопропионовая кислота (MPA), N-метилморфолин (NMM), N-метилпирролидон (NMP, Panreac), фосфатно-солевой буфер (PBS), триизопропилсилан (TIS), этандитиол (EDT), диметилсульфид (DMS), деионизованная вода (ДВ).

2.2 Получение водной дисперсии фуллерена C60

В ходе работы была использована водная дисперсия фуллерена C60, сырьем для получения которой являлся кристаллический фуллерен C60 производства НПК «НеоТекПродакт» (Санкт-Петербург Россия) с частотой 99,9 %. Хроматограмма исходного фуллерена C60 представлена на рисунке 3.

Хроматограмма фуллерена C 60

COSMOSIL Packet Column SHIMADZU LC - 20
 Mobile Phase: Toluene
 Flow Rate: 1 ml/min
 Temperature: 40 °C
 Detection: 320 nm
 Pressure: 4,7 MPa

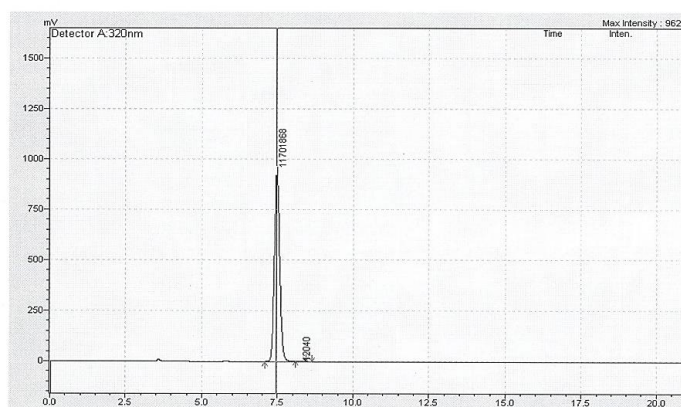


Таблица пиков

Пик	Фуллерен	Время, мин.	Содержание, %
1	C 60	7.464	99.8972
2		8.257	0.1028

Рисунок 3 – Хроматограмма фуллерена C60 (НПК «НеоТехПродакт»)

Порошок фуллерена C₆₀ (100 мг) растворяли в NMP (170 мл) при интенсивном перемешивании в течение 4 часов, полученный раствор тёмно-фиолетового цвета фильтровали через стекловолоконный фильтр (поры 3-5 мкм). Фильтрат смешивали с ДВ (170 мл), полученный буро-коричневый раствор переносили в емкость для ультраfiltrации. В качестве вытесняющей/разбавляющей жидкости использовали 0,01% водный раствор плуроника F-127 (полосамер 407). Раствор фуллерена в водно-органической смеси из емкости для ультраfiltrации непрерывно подавали с помощью перистальтического насоса в мембранный модуль (мембрана из регенерированной целлюлозы, поры отсечки до 100 кДа) в режиме рециркуляции. Фильтрат поступал в приемник для слива с NMP в качестве удаляемого компонента. Получаемый конечный продукт (концентрат ВРФ) оставался в емкости для ультраfiltrации. Процесс ультраfiltrации контролировали спектрофотометрией по снижению поглощения концентрата ВРФ при 193 нм до постоянного значения. После проводили концентрирование ВРФ до уровня около 1 г/л фуллерена C₆₀, определяемого спектрофотометрически, продолжая прокачивание жидкости через мембрану, но без подачи вытесняющей/разбавляющей жидкости. В итоге получали ВРФ (80 мл), концентрация фуллерена C₆₀ составляла ~1 г/л.

Полученное производное фуллерена C₆₀ представляло собой водную дисперсию фуллерена C₆₀, стабилизированного полосамером 407.

2.3 Получение синтетических катионных антимикробных пептидов

Все пептиды получали твердофазным методом на синтезаторе пептидов PS3 Peptide Synthesizer (Gyros Protein Technologies Inc., США) по протоколу Fmoc с использованием смеси HOBt/DIC в качестве конденсирующего агента. Цикл представлял собой промывку (DMF), удаление Fmoc-защиты (20 % 4-метил-пиперидин в DMF), предварительное активирование Fmoc-аминокислоты (DIC/HOBt), реакцию конденсации в среде DMF/NMP при двукратном избытке карбоксильного компонента (~0,5–1 ч). Контроль за полнотой реакции

осуществляли методом Кайзера (нингидриновый тест), после чего, при необходимости, повторяли реакцию конденсации (0,5 часа). Конечные пептиды отщепляли от полимера трифторуксусной кислотой в присутствии скавенджеров (TIS, EDT, вода, DMS). Сырой продукт осаждали сухим метил-третбутиловым эфиром, а пептид экстрагировали водной уксусной кислотой. Экстракт лиофилизировали с использованием сублиматора VirTis AdVantage 2.0 EL (SP Scientific, США).

Пептиды очищали методом препаративной ВЭЖХ-хроматографии на приборе LC-20 (Shimadzu, Япония) на колонке с обращенной фазой (C18) с использованием ацетонитрил — 0,1 % водная трифторуксусная кислота в качестве подвижной фазы (градиентная элюция).

2.4 Получение комбинированных соединений на основе катионных пептидов и фуллерена C60

В рамках предварительного этапа, перед присоединением катионных пептидов, получали производное фуллерена C60 (аддукт фуллерена C60 с лизином) – C60(Lys-MPA)_n, где n – число остатков Lys-MPA.

С этой целью к суспензии (BOC)-Lys в DMF добавляли BTSA; полученную смесь перемешивали (около 2 часов) до получения полупрозрачного слегка желтоватого раствора. Затем вносили фуллерен C60 и перемешивали полученную суспензию (3 суток при комнатной температуре). Затем добавляли ДВ для удаления (гидролиза) триметилсилильной защиты, которая при реакции с водой образует гидрофобный HMDSO. Продукт реакции C60-Lys(Boc.CF₃COOH)OH нерастворим и находится в осадке (коричневый). Его отделяли путем фильтрации на стеклянном фильтре, осадок на фильтре тщательно промывали водой и подсушивали. Сухой коричневый порошок растворяли в 15 мл трифторуксусной кислоты для удаления Boc-защиты, полученный раствор выдерживали (1 час), затем трифторуксусную кислоту упаривали (вакуум, 45°C). Остаток трижды промывали диэтиловым эфиром с декантацией для удаления следов трифторуксусной кислоты. Полученный аддукт очищали трехкратным

переосаждением из метанола диэтиловым эфиром и сушили в вакууме. Аддукт хорошо растворим в воде и метаноле, лиофильное высушивание водного раствора дает коричневый порошок.

Далее в колбу вносили аддукт C60-Lys и растворяли в DMF. В отдельный стеклянный флакон вносили МРА, растворяли в DMF и затем вносили DIC и HOBT. После инкубации (2-5 минут, перемешивание, комнатная температура) раствор с активированной МРА вносили в колбу с аддуктом C60(Lys)n. Туда же вносили NMM и оставляли (4 часа, интенсивное перемешивание). После этого в смесь вносили ДВ, переносили смесь в диализную трубку (Spectra/Por 7, MWCO 1 kDa). Исчерпывающий диализ проводили против ДВ с целью удаления низкомолекулярных компонентов. Полученный диализат подвергали лиофильной сушке.

Таким образом, к фуллерену присоединяли аминокислоту, затем ее аминогруппу модифицировали малеимидопропионовой кислотой с целью получения соединения с активированной двойной связью, через которую впоследствии присоединяли пептид, содержащий меркаптогруппу (реакция алкилирования).

Для облегчения реакции присоединения аминокислоты к фуллерену следовало перевести аминокислоту в гидрофобное состояние путем замены всех ее подвижных протонов триметилсилильной группой с целью ведения последующей реакции с фуллереном в гомогенной среде. Для этого использовали бис-триметилсилил-ацетамид.



R = -(CH₂)₄-NH₂, -CH₂-SH (т. е. лизин или цистеин)

Таким способом получали конъюгаты фуллерена с лизином, аргинином и цистеином.

Конъюгирование платформы C60(Lys-MPA)_n с синтетическим катионным дендримерным пептидом КК-46. Пептид КК-46 растворяли в PBS. В отдельной пробирке растворяли C60(Lys-MPA)_n в PBS и DMF. Оба раствора смешивали и инкубировали (5 часов), контролируя pH на уровне 7,5-8,0, используя pH-метр при постоянном перемешивании. Затем полученную дисперсию фильтровали через стекловолоконный фильтр (2.6 мкм, Sigma), полученный темно-оранжевый фильтрат подвергали исчерпывающему диализу против ДВ и лиофильно высушивали.

Конъюгирование платформы C60(Lys-MPA)_n с синтетическим катионным дендримерным пептидом ST-10. Пептид ST-10 растворяли в PBS, (pH 7,4). В отдельной пробирке растворяли C60(Lys-MPA)_n в PBS, или использовали готовый раствор/диализат. Оба раствора смешивали и инкубировали (3 часа), контролируя pH на уровне 7,5-8,0, используя pH-метр при постоянном перемешивании. Затем полученную дисперсию фильтровали через стекловолоконный фильтр (2.6 мкм, Sigma), фильтрат подвергали исчерпывающему диализу против ДВ и лиофильно высушивали.

Получение комплекса K14. Пептид АВ-14 растворяли в PBS и доводили pH раствора до 7,0. К полученному прозрачному раствору добавляли ВРФ (концентрация 1 мг C60/мл). При этом весовое соотношение фуллерен: пептид составляло 1:38. Далее смесь перемешивали (1 час, комнатная температура).

Получение комплексов K17 и K18. Комплексы K17 и K18 были получены аналогичным методом для катионных пептидов АВ-17 и АВ-18, весовые соотношения пептидов по отношению к фуллерену составляли 1:30 и 1:36, соответственно.

Электронные спектры поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies) в диапазоне от 190 до 800 нм, используя кварцевую кювету с толщиной 1 см. ИК-Фурье спектры регистрировали на приборе Bruker Alpha-IR (условия нарушенного полного

внутреннего отражения) с использованием лиофилизированных или высушенных в вакууме образцов.

Молекулярную массу анализировали, используя массспектрометр Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonic; США).

Определение размеров наночастиц и заряда (ζ -потенциал) проводили методом динамического светорассеяния (фотонная корреляционная спектроскопия), используя наносайзер Photocor Compact Z (Россия).

2.5 Культивирование клеточных культур

Культивирование клеток проводилось с использованием культуральных флаконов фирмы Eppendorf (площадь роста 75 см², объем 270 мл). Работу с клеточными культурами осуществляли в стерильных условиях. Перед пассированием клетки промывали фосфатно-солевым раствором Дульбекко (ПанЭко, Россия), затем диссоциировали клетки монослоя 0,25 % трипсином–EDTA (ПанЭко, Россия). Далее клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состав которой указан в таблице 2. Пассирование клеток осуществляли в соотношении 1:4 для клеточной линии mells 1:8 для A549, HeLa, Wi-38 с периодичностью 2–4 суток в зависимости от культуры.

Таблица 2 – Состав полных питательных сред для культивирования клеточных культур

Клеточная линия	mells, HeLa, Wi-38	A549
Компоненты среды	среда DMEM (Thermo FS, США)	среда F-12 Nutrient Mix (Thermo FS, США)
	HEPES (Thermo FS, США)	HEPES (Thermo FS, США)
	20% фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия)	10% фетальная бычья сыворотка (Capricorn Scientific, Германия)
	пенициллин – стрептомицин (Capricorn Scientific, Германия)	пенициллин – стрептомицин (Capricorn Scientific, Германия)
	glutaMAX (Thermo FS, США)	glutaMAX (Thermo FS, США)
	пируват натрия (Thermo FS, США)	пируват натрия (Thermo FS, США)

Для культивирования бактерий *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* использовали стандартные агаризованную (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 10 г/л, агар 15 г/л) и жидкую (без агара) LB-среды. Для культивирования бактерий *S. agalactiae* использовали агаризованную питательную среду с 5 % бараньей крови. Среду готовили с использованием Основы кровяного агара № 2 (протеозопептон 15 г/л, печеночный экстракт 2,5 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 5 г/л, агар 15 г/л) (Difco, США). Концентрации солей на лунку плоскодонного 96-луночного планшета (100 мкл) при тестировании антибактериальной активности катионных пептидов составили: 171,12 mM (NaCl для сред LB), 85,56 mM (NaCl для кровяного агара), а также 137 mM (NaCl), 2,7 mM (KCl), 10 mM (Na₂HPO₄), 1,8 mM (KH₂PO₄) для PBS.

2.6 Анализ антибактериальной активности

Модельными бактериальными культурами являлись:

1. Лабораторный штамм *E. coli* Dh5 α без О-антигена;
2. Природный изолят *E. coli* 4S с нормальным О-антигеном, выделенный из фекалий лошадей;
3. Мутантный штамм *E. coli* 4SI (rough производное штамма 4S [147]) с укороченным О-антигеном;
4. Мутантный штамм *E. coli* 4SR без О-антигена;
5. Мультирезистентный штамм *E. coli* (частично устойчив к имипенему и резистентный к цефотаксиму, левофлоксацину, гентамицину, смеси триметоприм/сульфаметокс, смеси амоксициллин/клавуланат, цефтазидиму, меропенему, амикацину, ципрофлоксацину)
6. Штамм *P. aeruginosa* PAO [66];
7. Мультирезистентный штамм *P. aeruginosa* (частично устойчив к цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, имипенему, резистентный к пиперациллину, тобрамицину, амикацину, ципрофлоксацину, тикарциллину, меропенему);
8. Штамм *S. aureus*;
9. Мультирезистентный штамм *K. pneumoniae*;
10. Мультирезистентный штамм *S. agalactiae*;
11. Мультирезистентный штамм *A. baumannii*.

Все культуры бактериальных клеток культивировались в лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ биотехнологии РАН).

В рамках первичного скрининга антибактериальную активность панели катионных пептидов изучали на примере лабораторного штамма *E. coli* Dh5 α методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков, методом серийных

микроразведений и методом подсчета колоний. Бактерицидную активность конъюгатов и комплексов КП и фуллерена C60 оценивали в отношении *E. coli* Dh5 α методом подсчета колоний. Антибактериальную активность наиболее перспективных по результатам первичного скрининга комплексов K14, K17, K18 и катионных пептидов, входящих в их состав, оценивали методами диффузии в агар без использования бумажных дисков и подсчета колоний в отношении других штаммов кишечной палочки, а также видов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *A. baumannii*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью.

2.6.1 Метод диффузии в агар с использованием бумажных дисков

Чашки Петри, содержащие LB-агар, равномерно засеивали штаммом *E. coli* Dh5 α (ОП₆₂₀=0,3-0,35), после чего на подсушенную поверхность агара помещали бумажные диски с фиксированной концентрацией исследуемого пептида. В качестве положительного контроля использовали известный антибиотик ампициллин (10 μ g на диск), в качестве отрицательного контроля – фосфатно-солевой буфер (PBS). Чашки инкубировали в течение 16-24 часов при 37 °C до определения результатов. Измерение зон задержки роста вокруг каждого из дисков проводили с помощью линейки с точностью до миллиметра, при этом измеряемый диаметр зоны проходил через центр диска.

2.6.2 Метод серийных микроразведений

Колонии *E. coli* Dh5 α инокулировали в жидкую среду LB, после чего проводили регулирование мутности суспензии для достижения оптимальной оптической плотности (ОП₆₂₀=0,3-0,35). В течение 15 минут после приготовления суспензии инокулята со скорректированной концентрацией готовили ее последовательные пятикратные разведения в бульоне LB, которые затем вносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета для культивирования клеток. Во все лунки в серии разведений, содержащие инокулят, а также лунки с положительным контролем, содержащие только бульон LB, добавляли

исследуемые пептиды в выбранных концентрациях. Также проводили контроль роста культуры в среде без антибиотика.

Инокулированный планшет инкубировали при температуре 37 °С в течение 4 часов с использованием анализатора Multiskan FC. Регистрацию оптической плотности проводили спектрофотометрически каждые 30 минут в течение инкубации при длине волны 620 нм. Оценка антимикробной активности основывалась на расчете минимальной ингибирующей концентрации, за которую принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста.

2.6.3 Метод подсчета колоний

Оптическую плотность бактериальной суспензии корректировали до оптимального показателя ($OP_{620}=0,3-0,35$), после чего суспензию разводили в бульоне LB в соотношении 1:2 и вносили в лунки плоскодонного 96-луночного планшета для культивирования клеток.

Бактериальную суспензию инкубировали с различными концентрациями тестируемых образцов (пептиды, ВРФ С60, их конъюгаты и комплексы) в течение 4 часов при 37 °С, а затем в виде капель наносили на поверхность подсушенной агаровой среды. Посев инкубировали в течение ночи при 37 °С.

Концентрацию жизнеспособных бактерий (общее микробное число) на 1 мл жидкой культуры определяли по формуле:

$$C = \frac{N*d}{V},$$

где N – сумма подсчитанных колоний, d – разведение бактериальной суспензии, V – объем высеянной культуры (мл).

Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ колониобразующих единиц (КОЕ)/мл.

Оценка антимикробной активности основывалась на подсчете колоний и последующем расчете минимальной бактерицидной концентрации (МБК), за которую принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую гибель 99,9 % микроорганизмов. Экстраполяцию полученных данных осуществляли с построением кривой «доза — эффект» по уравнению Хилла:

$$Y = \frac{100}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{X}\right)^h},$$

где IC_{50} – доза антибактериального агента, обеспечивающая гибель 50 % микроорганизмов, h – коэффициентом Хилла, который равен максимальному тангенсу наклона кривой, Y – процент гибели микроорганизмов, X – доза антибактериального агента.

2.6.4 Метод диффузии в агар без использования бумажных дисков

Оценку активности комплексов проводили методом диффузии в агар без использования бумажных дисков. В рамках данного метода выбранные концентрации тестируемого соединения (0,7, 0,14, 0,029 и 0,0058 mM) каплями объёмом 10 мкл наносили на бактериальный газон. В качестве положительного контроля были использованы антибиотики ампициллин и канамицин. Чашки Петри с каплями инкубировали при 37 °C. Через 16–24 часов оценивали зону подавления роста бактерий.

2.7 Анализ цитотоксичности катионных пептидов методом МТТ-теста

Оценку цитотоксичности тестируемых соединений проводили с использованием следующих эукариотических клеточных линий: Wi-38 (диплоидные фибробласты человека), A549 (аденокарцинома легкого человека), HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека), mells (меланома человека). Клеточные линии Wi-38, A549 и HeLa были приобретены в институте вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Низкодифференцированная клеточная линия mells получена в 1998 году из опухолевого материала пациента с диагнозом: «Меланома кожи левого бедра (T4b2N3M1a) с метастазами в паховые лимфатические узлы с двух

сторон, селезенку» в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [11].

Определение цитотоксичности проводили, используя классический МТТ-тест. Клетки засевали в 96-луночный планшет в количестве $15 \cdot 10^3$ клеток на лунку в 100 мкл полной питательной среды и инкубировали 24 часа (37 °C) в CO₂-инкубаторе. Методом последовательного разведения готовили в лунках концентрации исследуемых препаратов (0,7, 2,1, 6,2, 18,5, 55,6, 167 и 500 мкг/мл) и инкубировали (24 часа, 37 °C) в CO₂-инкубаторе. Затем в каждую лунку добавляли МТТ в PBS с концентрацией 4 мг/мл и помещали в CO₂-инкубатор. Через 4 часа добавляли SDS (20 % SDS в воде с 0,02N H₂SO₄). Оценку цитотоксичности осуществляли путем вычисления процентного соотношения количества жизнеспособных клеток к общему количеству клеток в популяции через 36 часа после внесения исследуемых препаратов. Разницу оптической плотности определяли при 570 и 650 нм с использованием прибора MultiscanGO (Thermo Scientific, Финляндия). Количественным критерием цитотоксичности исследуемых соединений служил индекс IC₅₀, отражающий концентрацию соединений, вызывающую гибель 50 % клеток. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных в отсутствие исследуемых препаратов (контроль). Ингибирование роста 50 % клеток (IC₅₀) рассчитывали путем построения линейной зависимости.

2.8 Оценка противовоспалительной активности на модели эндотоксического шока *in vivo*

Для моделирования патологических состояний человека на мелких лабораторных животных были выбраны мыши самки линии BALB/c весом 18-20 г., полученные из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ГНЦ ИБХ РАН (г. Пущино, Московская область, Россия). К включению в эксперимент допускались животные, прошедшие период карантинирования в течение не менее 7 суток, во время которого проводился ежедневный поголовный визуальный осмотр. Работа с лабораторными животными была проведена в соответствии с

Директивой Европейского парламента и Совета 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, ГОСТ 33044: Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ENV/MC/CHEM(98) 17 OECD Principles on Good Laboratory Practice и «Положением об этическом отношении к лабораторным животным «ГНЦ Института иммунологии» ФМБА России». Животные содержались в клетках Sealsafe NEXT для индивидуально-вентилируемого комплекса содержания мышей на 72 клетки с модулем вентиляции SmartFlow (Tecniplast, Италия). Животным был обеспечен неограниченный доступ к воде (ГОСТ Р 51232-98 "Государственный стандарт Российской Федерации. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества") и гранулированному полнорационному комбикорму Дельта Фидс для содержания мелких лабораторных животных: мышей и крыс (БиоПро, Россия).

2.8.1 Моделирование нелетального LPS-индуцированного шока *in vivo*

Поскольку стремительная потеря массы тела является одним из основных признаков сепсиса, проводили оценку способности исследуемых комплексов влиять на развитие данного клинического симптома. С целью воспроизведения нелетального эндотоксического шока мышам-самкам линии BALB/c внутрибрюшинно вводили 300 µg LPS, полученного из *Vibrio cholerae* Inaba 569B (Sigma, Германия). Через 30 минут после введения эндотоксина, животным групп «ВРФ», «К14», «К17» и «К18» дополнительно внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения в соответствии со схемой эксперимента, представленной в таблице 3. Вес животных регистрировали ежедневно в течение 3 суток с момента введения LPS.

Таблица 3 – Схема эксперимента: группы животных и дозы

№ группы	Название группы	Доза исследуемого препарата, мкг/особь массой 20 г				Объем введения, мкл/на особь массой 20 г
		Фуллерен C60	AB-14	AB-17	AB-18	
1	Модель	0	0	0	0	300
2	ВРФ	20	0	0	0	200
3	K14	20	15	0	0	100
4	K17	20	0	70	0	100
5	K18	20	0	0	15	100
7	Интактные	0	0	0	0	0

2.8.2 Моделирование летального LPS-индуцированного шока *in vivo*

Для моделирования состояния летального эндотоксического шока мышам-самкам линии BALB/c внутрибрюшинно вводили 80 мкг LPS, полученного из *E. coli* K-235 (Sigma, Германия). В качестве профилактической терапии животным внутрибрюшинно вводили ВРФ (группа «ВРФ») и растворы комплексных соединений K14, K17 и K18 (группы «K14», «K17» и «K18», соответственно) за 24 часа и за 1 час до введения эндотоксина. Дозы были рассчитаны на основании результатов анализа антибактериальной активности комплексов AB-14, AB-17 и AB-18. В качестве контрольного соединения использовали препарат Дексаметазон (КРКА д.д., Словения) в форме раствора для инъекций, который вводили по аналогичной схеме (группа «Дексаметазон»). Для сравнения с группой «Модель» (животные получали инъекцию LPS и не получали терапию) и оценки успешности воспроизведения патологического состояния была сформирована группа «Интактные» (манипуляции на животных не проводились). Дозы исследуемых препаратов, в частности компонентов комплексов, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Схема эксперимента: группы животных и дозы

№ группы	Название группы	Доза исследуемого препарата, мкг/особь массой 20 г					Объем введения, мкл/на особь массой 20 г
		Фуллерен C60	AB-14	AB-17	AB-18	Дексаметазон	
1	Модель	0	0	0	0	0	100
2	ВРФ	20	0	0	0	0	200
3	K14	20	15	0	0	0	100
4	K17	20	0	70	0	0	100
5	K18	20	0	0	15	0	100
6	Дексаметазон	0	0	0	0	100	100
7	Интактные	0	0	0	0	0	0

2.9 Оценка ранозаживляющей активности на модели раневого поражения кожи *in vivo*

2.9.1 Моделирование раневого поражения кожи *in vivo*

Для воспроизведений хирургической раны использовали самок мышей линии BALB/с массой 18-20 г из питомника НПП «Питомник лабораторных животных» (Филиал ГНЦ ИБХ РАН, г. Пущино). Непосредственно перед моделированием полнокожных ран, в первый день эксперимента, шерсть в области операционного поля на спине животных брили с использованием электрической бритвы для стрижки животных (Moser, Германия). Оперативное вмешательство по нанесению хирургических ран животным осуществляли под анестезией. Операционное поле обрабатывали 70 % этиловым спиртом, после чего с помощью анатомического пинцета и хирургических ножниц через натянутую кожную складку вырезали фрагмент кожи со спины размером 1 x 1 см. Наличие раны не угнетало двигательную активность и аппетит животных.

2.9.1.1 Оценка ранозаживляющей активности

Прежде всего, было проведено изучение ранозаживляющей активности комплексов ASM-45 и ASM-46, полученных на основе пептидов KK-46 и ST-10, соответственно. В рамках данного исследования через 24 часа после операции на раневую поверхность наносили мазевую композицию, приготовленную

предварительно, содержащую водную дисперсию фуллерена C60 (группа «ВРФ»), раствор катионного пептида (группы «КК-46» и «ST-10»), конъюгат на основе катионного пептида и фуллерена C60 (группы «ASM-45» и «ASM-46») или фосфатно-солевой буфер (группа «Модель»). Мазевую композицию получали смешением раствора исследуемого соединения, вазелина и пальмитата сахарозы в соотношении 40:36:24, соответственно, по весу. Для гомогенизации мазовой композиции использовали T 25 digital ULTRA-TURRAX (IKA, Германия). В группу «Интактные» входили мыши, на которых не проводили никаких манипуляций. Мазь наносили равномерно на поверхность раны один раз в сутки в течение 11 дней. На 12-й день эксперимента раны фотографировали индивидуально для каждого животного, после чего животных подвергли эвтаназии.

В рамках второго эксперимента проводили оценку ранозаживляющей активности комплексов K14, K17, K18, полученных на основе пептидов АВ-14, АВ-17 и АВ-18, соответственно. Терапию проводили, нанося на раневую поверхность предварительно приготовленную мазь, содержащую водную дисперсию фуллерена C60 (группа «ВРФ»), раствор катионного пептида (группы «АВ-14» и «АВ-18»), комплекса на основе катионного пептида и фуллерена C60 (группы «K14» и «K18», соответственно) или фосфатно-солевой буфер (группа «Модель»). Животным группы положительного контроля наносили на раны известный препарат Бепантен Плюс (группа «Бепантен Плюс»), животные группы «Интактные» не подвергались хирургическому вмешательству. Мазь наносили в течение 10 дней. В последний (11-й) день эксперимента раны каждого животного фотографировали, после чего животных умерщвляли. После эвтаназии от каждого животного отбирали фрагмент кожи в области раны с целью последующей оценки уровня экспрессии генов, участвующих в регенеративном процессе кожи.

2.9.2 Оценка эффективности заживления хирургической раны

Эффективность заживления ран оценивали посредством ежедневного измерения раны в продольном и поперечном направлениях. Площадь раны рассчитывали по формуле:

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

где S_{el} – площадь эллипса, a – большая полуось (половина длинного диаметра или поперечного размера), b – малая полуось (половина короткого диаметра или продольного размера) [9, 245]. Результаты выражали в мм² и процентах от исходной площади, проводя расчёты индивидуально для каждого животного.

2.10 Пробоподготовка биологических образцов

Биологический материал помещали в пробирки для гомогенизации Lysing Matrix D с керамическими шариками (MP Biomedicals, США) и доводили объем содержимого до 1 мл посредством добавления лизирующего буфера (Qiagen, Германия). Образцы гомогенизировали (1 минута), используя механический гомогенизатор FastPrep-24 (MP Biomedicals, США). Далее, полученные гомогенаты центрифугировали (1 минута, 10 000 оборотов/мин), используя центрифугу Microspin 12 (BioSan, Латвия), затем отбирали 100 мкл полученного гомогената и разбавляли 300 мкл лизирующего буфера. Образцы центрифугировали (3 минуты, 10 000 оборотов/мин), после чего отбирали 350 мкл супернатанта для дальнейшего выделения РНК.

Матричную РНК (мРНК) из тканей лёгких, почек, печени или кожи мышей экстрагировали с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Далее методика описана на примере одного образца.

К 350 мкл образца (лизата) добавляли 350 мкл 70 % этилового спирта. После ресуспендирования смесь (700 мкл) переносили в спин-колонки из набора и центрифугировали (1 минута, 10 000 оборотов/мин, 20 °С) на центрифуге Microspin 12 BioSan. Колонку извлекали из пробирки, содержимое пробирки

утилизировали и пробирку использовали вновь. Далее в колонку вносили буфер RW1 (700 мкл), образец центрифугировали (1 минута, 10 000 оборотов/мин, 20 °C), содержимое пробирки вновь утилизировали. На следующем этапе в колонку вносили буфер RPE (500 мкл), центрифугировали колонку при тех же условиях и утилизировали содержимое пробирки. Далее повторяли этот шаг, но центрифугирование проводили в течение 2 минут, предварительно заменив пробирку колонки на новую. После дополнительного центрифугирования (1 минута, 10 000 оборотов/мин, 20 °C) в колонку вносили RNA-free water (30 мкл) из набора. Пробирки инкубировали 2 минуты при комнатной температуре, после чего центрифугировали (1 минута, 10 000 оборотов/мин, 20 °C).

Концентрацию мРНК определяли с использованием спектрофотометра видимого диапазона NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные образцы хранили при температуре –70 °C.

Синтез кДНК путем обратной транскрипции проводили с использованием набора «Реверта–L» (Интерлабсервис, Россия). Далее представлен расчет количества реагентов на 12 реакций: 125 мкл RT-mix, 5 мкл RT-Gmix-1, 6 мкл ревертазы (MMIv), 240 мкл ДНК-буфера amplisense.

Для приготовления общей реакционной смеси в пробирку типа Эппендорф (1,5 мл) добавляли необходимый объем RT-Gmix-1 и RT-mix, затем вортексировали и центрифугировали смесь на установке Microspin FV-2400 Biosan, добавляли ревертазу и ресуспендировали пипетированием. Готовую реакционную смесь аликвотировали по 10 мкл в новые пробирки, в которые затем индивидуальными наконечниками вносили по 10 мкл соответствующих образцов мРНК. После вортексирования и центрифугирования смеси пробирки помещали в термостат ТТ-2 «Термит» (ДНК – Технология, Россия) на 30 минут при 37 °C, а затем в каждую пробирку добавляли по 20 мкл ДНК-буфера, после чего смесь снова вортексировали и центрифугировали в тех же условиях. Полученные образцы хранили при температуре –70 °C и впоследствии использовали для

постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР–РВ).

2.11 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для определения уровня экспрессии исследуемых генов был выбран метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Общую реакционную смесь готовили в стерильной пробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл с использованием набора реактивов СИНТОЛ (Россия) (таблица 5). В микропробирки стрипов объемом 200 мкл (ПанЭко, Россия) в соответствии со схемой эксперимента вносили по 17 мкл общей реакционной смеси, затем добавляли в них по 3 мкл соответствующего образца кДНК и центрифугировали на установке Microspin FV–2400 Biosan. Конечный объем реакции составлял 20 мкл. Реакцию проводили в амплификаторе IQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System в условиях теплового цикла в соответствии с таблицей 6.

Таблица 5 – Состав общей реакционной смеси для ПЦР–РВ

Реагенты	Объём для одной реакции, мкл	Объём смеси для N реакций, мкл
2.5x Реакционная смесь*	8	8 * N
MgCl ₂ (25мМ)	1	1 * N
ddH ₂ O (деионизированная вода)	7	7 * N
Смесь праймеров (10 пкмоль/мкл)	1	1 * N
Флуоресцентный зонд (10 пкмоль/мкл)		

*Смесь содержит 2.5x ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 мМ MgCl₂, SynTaq ДНК–полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат).

Таблица 6 – Температурный профиль ПЦР–РВ

Шаг	Температура, °С	Время, с	Количество циклов
Начальный шаг активации ПЦР	95	120	45
Денатурация (флуоресцентная детекция)	58	20	
Отжиг, элонгация	95	40	

В качестве выравнивающего гена был выбран ген *Hprt*. Уровень экспрессии указанных целевых генов рассчитывался относительно уровня экспрессии выравнивающего гена.

Последовательности праймеров и зондов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Последовательности праймеров и зондов определяемых генов

Название праймера*	Последовательность (5'–3')	Ген-мишень
mHPRT-f	TATACCTAATCATTATGCCGAGGAT	<i>Hprt</i>
mHPRT-r	CTTTAATGTAATCCAGCAGGTCAG	
mHPRT-z	(FAM)TCCTCATGGACTGATTATGGACAGGACT(BHQ1)	
mTNF- α -f	CTGGGCCATAGAACTGATGAG	<i>Tnfa</i>
mTNF- α -r	GCTCTTCTGTCTACTGAACTTCG	
mTNF- α -z	(FAM)TGAGAAGTTCCCAAATGGCCTCCC(BHQ1)	
mIL-6-f	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGG	<i>Il6</i>
mIL-6-r	GTTTCTGTATCTCTCTGAAGGACTC	
mIL-6-z	(FAM)CTGGTCTTCTGGAGTACCATAGCTACCTGG(BHQ1)	
mIL-10-f	GGTAGAAGTGATGCCCCAG	<i>Il10</i>
mIL-10-r	ACTGCCTTGCTCTTATTTTCAC	
mIL10-z	(FAM) TGGGTGAGAAGCTGAAGACCCTCAG (BHQ1)	
mIL-1 α -f	CTCAGATTACAACTGTTTCGTG	<i>Il1a</i>
mIL-1 α -r	GTCGGTCTCACTACCTGTGATG	
mIL-1 α -z	(FAM)CGTGTTGCTGAAGGAGTTGCCAGA(BHQ1)	
mIL-1 β -f	GTAATGAAAGACGGCACACC	<i>Il1b</i>
mIL-1 β -r	TCTATCTTGTTGAAGACAAACCG	
mIL-1 β -z	(FAM)GCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGC(BHQ1)	
mIL-1RA-f	TCATTGTCTCATGGTGCCT	<i>Il1rn</i>
mIL-1RA-r	CAAAACGATCTGATTTGGATATTC	
mIL-1RA-z	(FAM)CTGTCTGTCGCTGGAGATTGACGTAT(BHQ1)	
mHIF-1 α -f	AGAATGAAGTGCACCCTAAC	<i>Hif1a</i>
mHIF-1 α -r	GTTACTGTTGGTATCATAGACATG	
mHIF-1 α -z	FAM-CCGGGGGAGGACGATGAACATCAAG-BHQ1	
mTGF- β 1-f	CTGAACCAAGGAGACGGAAT	<i>Tgfb1</i>
mTGF- β 1-r	CTGATCCCGTTGATTTCCAC	
mTGF- β 1-z	(FAM)GCGCTCACTGCTCTTGTGACAGC(BHQ1)	
mEGF-f	AGCCACGCTTACATTCATTC	<i>Egf</i>
mEGF-r	TGAAGACAAACTGTGCCGT	
mEGF-z	(FAM)GCTCCGTCCGTCTTATCAGGCATC(BHQ1)	
mFGF-b-f	GTGTGCCAACCGGTACCT	<i>Fgf2</i>
mFGF-b-r	TGCCACATACCAACTGGAGT	
mFGF-b-z	(FAM)GACGGCTGCTGGCTTCTAAGTGTGT(BHQ1)	
mVEGF-A-f	CTTCAAGCCGTCCTGTGTG	<i>Vegfa</i>
mVEGF-A-r	GTGATGTTGCTCTCTGACGTG	
mVEGF-A-z	(FAM)CTGTGCAGGCTGCTGTAACGATG(RTQ1)	
mFLG-f	GCTCAGGAGGAAGAGGACAG	<i>Flg</i>
mFLG-z	(FAM) CAAGTCCATTCTGGAGTCCAGGTCG (BHQ1)	
mFLG-r	ATTCATATCCTCCCTGACCACT	

Продолжение таблицы 7

Название праймера*	Последовательность (5'–3')	Ген-мишень
mFoxp3-f	TCACCTATGCCACCCTTATC	<i>Foxp3</i>
mFoxp3-r	TTCTGAAGTAGGCGAACATG	
mFoxp3-z	(FAM)CGGAGAGGCAGAGGACACTCAATG(BHQ1)	
mA2aAR-f	CACCAACTTCTTCGTGGTAT	<i>Adora2a</i>
mA2aAR-r	ATAGCCAAGAGGCTGAAGAT	
mA2aAR-z	(FAM)CTCTTCTTCGCCTGCTTTGTCCTGGT(RTQ1)	
mIFN- γ -f	AAATCCTGCAGAGCCAGATTAT	<i>Ifng</i>
mIFN- γ -r	GCTGTTGCTGAAGAAGGTAGTA	
mIFN- γ -z	(ROX)ACGCTTATGTTGTTGCTGATGGCC(RTQ2)	
mIL-4-f	GAGAGTGAGCTCGTCTGTAGG	<i>Il4</i>
mIL-4-r	TCAGTGATGTGGACTTGGAC	
mIL-4-z	(ROX)ATGCCTGGATTTCATCGATAAGCTGCA(RTQ2)	
mHMGB1-f	GGCAAAGGAGATCCTAAGAAGC	<i>Hmgb1</i>
mHMGB1-r	TGAGAAGTTGACAGAAGCATCC	
mHMGB1-z	(FAM)GCCGGGAGGAGCACAAGAAGAAG(BHQ1)	

* f – прямой (forward) праймер; r - обратный (reverse) праймер; z – зонд.

2.12 Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Краскела-Уоллиса с последующим применением апостериорного критерия Данна или по U-критерию Манна-Уитни.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Проектирование и получение катионных пептидов

На первом этапе исследования были проведены работы по созданию библиотеки синтетических катионных антимикробных пептидов, потенциально обладающих высокой антибактериальной активностью и низкой токсичностью. Для разработки панели КП были использованы базы данных уже имеющихся пептидов, такие как DBAASP, BaAMPs и TCDB, а также данные литературы по биологической (антибактериальной) активности КП.

Известно, что короткие пептидные последовательности рассматриваются как оптимальные кандидаты для фармацевтического применения из-за их низкой стоимости производства вследствие более простых синтеза и модификации, более высокой стабильности и низкой цитотоксичности. В связи с этим, в рамках данной работы был проведен мониторинг баз данных пептидов на предмет коротких последовательностей с низкой цитотоксичностью.

Был осуществлен поиск положительно заряженных последовательностей, то есть с высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, аргинина и лизина, с общим зарядом от +1 до +12 и длиной не более 25 аминокислотных остатков. Среди них предпочтение отдавалось наиболее коротким пептидам с высоким содержанием гидрофобных аминокислотных остатков (порядка 40-50 %) с выявленной противомикробной активностью в отношении целевого патогена. Положительно заряженные пептиды были выбраны благодаря их способности электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными бактериальными мембранами, приводя к нарушению их целостности и гибели микроорганизмов при сохранении селективности в отношении клеток млекопитающих.

Таким образом, предварительный поиск внутри выбранной базы данных проводился, исходя из таких критериев, как: длина последовательности, сложность молекулы (мономер), и целевая группа патогенов (грам-положительные и грам-отрицательные бактерии). В результате сортировки по

выбранным параметрам был получен ранжированный список последовательностей, соответствующих условиям поиска. На этом же уровне параллельно проводился поиск КП по группам пептидов с известными физико-химическими свойствами и биологической активностью. Так, одними из наиболее часто используемых в качестве шаблонов пептидов являются магайнины и протегрины, среди которых обнаруживаются небольшие последовательности с зарядом в среднем от +3 до +8, что соответствовало критериям поиска.

После получения ранжированного списка релевантных вариантов пептидов последовательности были проанализированы на предмет заряда, гидрофобности и амфифильности. Особое внимание уделялось вторичной структуре пептида. Предпочтительными считались КП с α -спиральной структурой, являющиеся наиболее распространенной в природе группой литических пептидов. Пептиды, принимающие α -спиральные конформации, хорошо подходят для разрушения бактериальной мембраны, поскольку распределение заряда, гидрофобность и амфипатичность спиралей коррелируют с активностью мембраны.

Выбранные, исходя из вышеописанных критериев, КП также были проанализированы на наличие токсичности в отношении клеток млекопитающих. Отобранные при помощи алгоритма подбора пептиды были пригодны для использования в качестве шаблонов для последующей модификации при разработке дизайна новых последовательностей КП (таблица 8).

Таблица 8 – Панель катионных синтетических пептидов, потенциально обладающих антибактериальной активностью

№	Шифр	Последовательность	Мол. масса, Да	Заряд pH 7
1	A-69	KIAKRIWKILRRR-NH ₂	1737	+8
2	AB-4	(RRRLIKFI) ₂ KKNTS-NH ₂	2754	+10
3	AB-5	KKLRLKTAFK-NH ₂	1231	+6
4	AB-13	R ₈ K ₄ K ₂ KACAC-NH ₂	2512	+16
5	AB-14	(WKKIRVRLS) ₂ KAC-NH ₂	2638	+8
6	AB-17	AGKLLKRLKLLKKLLKC-NH ₂	2079	+8
7	AB-18	(R) ₂ KGGKLLKRLKLLKKLLKC-NH ₂	2506	+11
8	Ac-TA-13	R ₈ (K) ₄ (K) ₂ KAC-NH ₂ acetate	2338	+16
9	AM-7	(K) ₄ (K) ₂ KARGDC-NH ₂	1417	+8
10	bTA-13	R ₈ (K) ₄ (K) ₂ KAC-NH ₂ deionized	2338	+16
11	BA-1	GLKKLFISKIKIIGSALKNLA-NH ₂	2142	+6
12	D-4	(RRSARL) ₂ KPAPPC-NH ₂	2093	+8
13	D-6	R ₄ K ₂ KAM-NH ₂	1228	+8
14	D-8	R ₄ K ₂ G ₂ KPI-NH ₂	1350	+8
15	D-11	K ₂ V ₂ KVK-NH ₂	827	+5
16	D-12	R ₄ K ₂ K-NH ₂	1026	+8
17	D-21	(RQR) ₂ KIK) ₂ KYRLQQC-NH ₂	3439	+12
18	D-22	R ₈ K ₄ V ₄ K ₂ KPYC-NH ₂	2925	+16
19	KK-46	(R ₂ KWTPEV) ₄ K ₂ H ₂ KFC-NH ₂	5140	+12
20	KK-50	R ₄ K ₂ G ₂ KAWWC-NH ₂	1688	+8
21	KK-58	(RLFR) ₄ K ₂ KLRMKLP-NH ₂	3442	+14
22	NC-772	CKRRRRRRRRRRR-NH ₂	1967	+12
23	NC-783	KRRGGGKLLKLLKLLKLLKC-NH ₂	2505	+9
24	NC-784	GRKKRRQRRRG-NH ₂	1454	+8
25	NC-789	GRKKRRQRRRCG-NH ₂	1557	+8
26	NC-803	(RRRKK) ₂ KKKAC-NH ₂	2026	+14
27	NC-811	R ₈ (K) ₄ (K) ₂ KAC-NH ₂	2338	+16
28	P-148-Cys (ПД)	LKRVWKRVPKLLKRYWRQLKKPVRC-NH ₂	3328	+11

Продолжение таблицы 8

№	Шифр	Последовательность	Мол. масса, Да	Заряд pH 7
29	S-07	MITHACYTRTRHKNHKLKKT ₂ L-NH ₂	2876	+7
30	ST-10	(KKLRLKTA ₂ FK) ₂ KAC-NH ₂	2749	+12
31	ST-11	KIAKRIWKILLRKKAC-NH ₂	1968	+8
32	ST-13	(Ac-PHSCNGAK) ₂ KAF-NH ₂	2037	+2
33	ST-15	GYNYLYRLFRKSNLKP-NH ₂	2031	+4
34	ST-19	R ₄ Y ₄ L ₄ R ₄ H ₄ G ₄ K ₂ L ₂ KP-NH ₂	3856	+12
35	TA-19	R ₈ K ₄ K ₂ KA-NH ₂	2236	+16

На основе шаблонных аминокислотных последовательностей была сконструирована и синтезирована панель из 35 синтетических катионных пептидов с зарядом от +2 до +16 и молекулярной массой не более 5кДа (за исключением КК-46, чья молекулярная масса составила 5140 Да), потенциально обладающих антибактериальной активностью. Далее проводили оценку антибактериальной активности пептидов на примере модельного микроорганизма – лабораторного штамма кишечной палочки.

3.2 Изучение антибактериальной активности катионных пептидов

3.2.1 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов в отношении лабораторного штамма *E. coli* Dh5α

Оценка антибактериальной активности была проведена для библиотеки катионных пептидов, которые предположительно должны обладать высокой противомикробной активностью и низкой токсичностью.

3.2.1.1 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков

Первичный скрининг синтетических пептидов на наличие антибактериальной активности был проведен с использованием неинфекционного лабораторного штамма кишечной палочки (Dh5α). Методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков было показано, что из 35 синтезированных

пептидов 15 пептидов обладают антибактериальной активностью в отношении данного штамма. На рисунке 4 представлена фотография чашки Петри после проведения исследования методом диффузии из диска в агар для синтетических пептидов А-69, ST-10, ВА-1 и антибиотика ампициллина (положительный контроль).

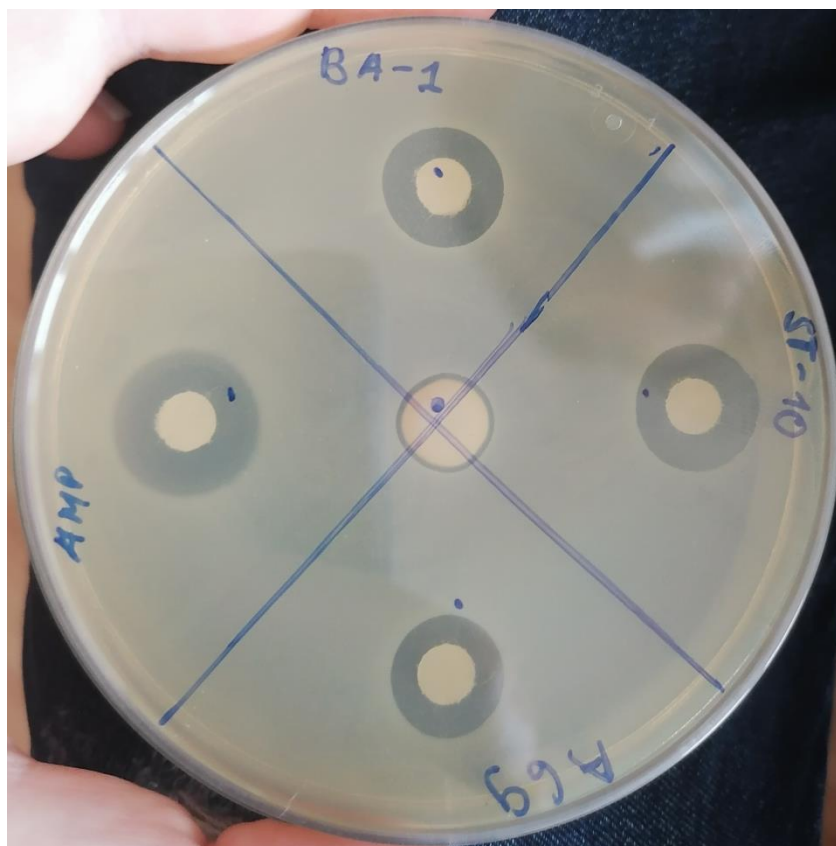


Рисунок 4 – Фотография чашки Петри после проведения исследования методом диффузии из диска в LB агар для пептидов А-69, ST-10, ВА-1 и ампициллина (Amp) на примере *E. coli* Dh5α

На изображении представлены зоны лизиса вокруг бумажных дисков с тестируемыми соединениями. Исходя из рисунка видно, что диаметры зон лизиса пептидов А-69, ST-10 и ВА-1 были сопоставимы с диаметром зоны лизиса ампициллина.

Результаты оценки антибактериальной активности всей панели катионных пептидов методом диффузии из диска в агар представлены в виде процента зоны лизиса относительно контрольного препарата (ампициллина) в таблице 9.

Таблица 9 – Антибактериальная активность катионных пептидов, определенная методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков, в отношении *E. coli* Dh5 α (n = 3)

№	Шифр	Процент лизиса	№	Шифр	Процент лизиса
1	A-69	38	19	KK-46	35
2	AB-4	63	20	KK-50	0
3	AB-5	0	21	KK-58	0
4	AB-13	0	22	NC-772	0
5	AB-14	68	23	NC-783	35
6	AB-17	63	24	NC-784	0
7	AB-18	71	25	NC-789	0
8	Ac-TA-13	26	26	NC-803	0
9	AM-7	0	27	NC-811	0
10	bTA-13	38	28	P-148-Cys (ПД)	72
11	BA-1	59	29	S-07	55
12	D-4	0	30	ST-10	82
13	D-6	0	31	ST-11	71
14	D-8	0	32	ST-13	0
15	D-11	0	33	ST-15	0
16	D-12	0	34	ST-19	71
17	D-21	0	35	TA-19	0
18	D-22	0			

Антибактериальную активность проявили катионные пептиды с шифрами A-69, AB-4, AB-14, AB-17, AB-18, Ac-TA-13, bTA-13, BA-1, KK-46, NC-783, P-148-Cys (ПД), S-07, ST-10, ST-11, ST-19, при нанесении на LB агар которых процент зоны лизиса (относительно зоны лизиса при нанесении ампициллина) составил 38, 63, 68, 63, 71, 26, 38, 59, 35, 35, 72, 55, 82, 71 и 71 соответственно. Для пептидов KK-46, P-148-Cys (ПД), AB-4, A-69, ST-10, AB-14, AB-17 и AB-18 было принято решение продолжить изучение антибактериальной активности в

отношении *E. coli* Dh5 α другими методами, в том числе для того, чтобы оценить их активность в динамике.

Метод диффузии из диска в агар был качественным, поскольку не позволял точно оценить антибактериальную активность пептидов. Так, например, диаметр зоны лизиса для пептида АВ-14 составлял 10 мм (0,7 mM) и 8 мм (0,14 mM), в то время как для пептида ST-10 - 12 и 9 мм при тех же концентрациях, соответственно. Это позволяло предположить, что ST-10 обладает более выраженной антибактериальной активностью в сравнении с АВ-14, однако это было опровергнуто в дальнейшем (раздел 3.1.1.3). Вероятно, это было связано с недостатками метода диффузии в агар с использованием бумажных дисков, а именно зависимостью результатов метода от свойств тестируемых соединений (растворимости, молекулярной массы и др.), не связанных с их активностью и, как следствие, ограниченности диффузии в питательную среду для отдельных веществ.

В связи с этим, далее была проведена оценка антибактериальной активности исследуемых пептидов с использованием стандартизованного метода оценки – метода серийных микроразведений.

3.2.1.2 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом серийных микроразведений

Методом серийных разведений была определена минимальная ингибирующая концентрация катионных пептидов, признанных наиболее перспективными по результатам исследования методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков (КК-46, Р-148-Cys (ПД), АВ-4, А-69, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18). За минимальную ингибирующую концентрацию принимали минимальную концентрацию, вызывающую заметное невооруженным глазом подавление роста бактериального штамма на средах в стандартных условиях опыта. Подавление роста *E. coli* Dh5 α на примере одновременно нескольких разведений бактериальной суспензии отслеживали методом серийных

микроразведений с использованием 96-луночных микропланшетов. Так, на рисунке 5 представлены данные по активности пептида А-69.

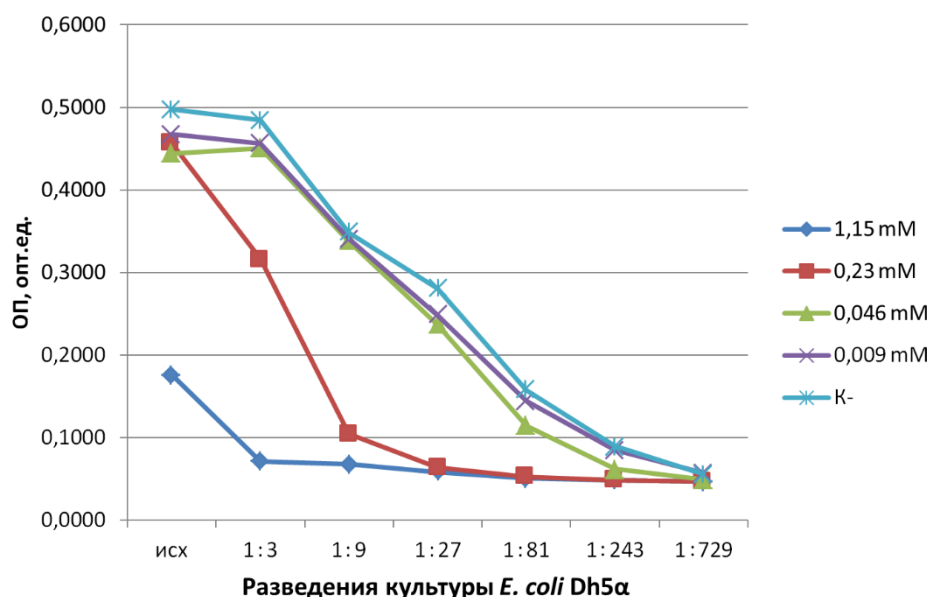


Рисунок 5 – Кривые роста культуры *E. coli* Dh5α при воздействии разных концентраций пептида А-69 (n = 3)

Показано, что при обработке бактериальной культуры штамма *E. coli* Dh5α пептидом А-69 в концентрации 1,15 mM происходит видимое невооруженным глазом подавление роста бактериальной культуры почти до фоновых значений ОП. Таким образом, данная концентрация была принята за МИК. В присутствии 0,23 mM пептида существенное подавление роста наблюдалось только при разведении культуры в три и более раз, то есть, видимо, только при подобном соотношении концентраций пептида и бактериальных клеток в среде достигается насыщение поверхности бактериальных мембран пептидами, необходимое для лизиса клеток. Далее, представлены результаты определения МИК для пептида ST-10 (рисунок 6).

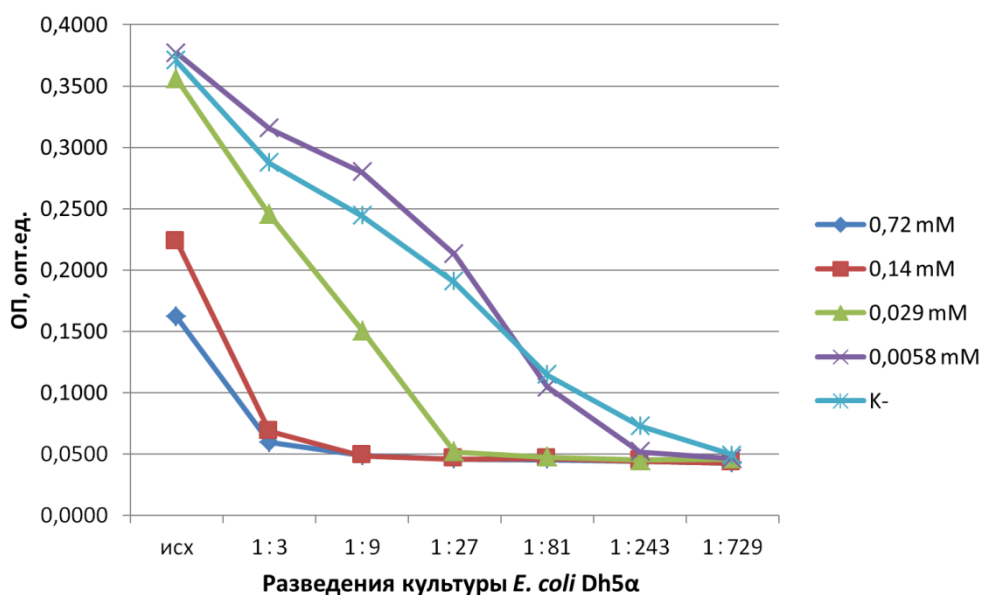


Рисунок 6 – Кривые роста культуры *E. coli* Dh5α при воздействии разных концентраций пептида ST-10 (n = 3)

На графике видно, что пептид ST-10 был способен в значительной степени подавлять рост штамма *E. coli* Dh5α как в максимальной концентрации (0,72 mM), так и в концентрации 0,14 mM на 57 % и 38 %, соответственно.

На рисунке 7 представлен анализ антибактериальной активности пептида КК-46.

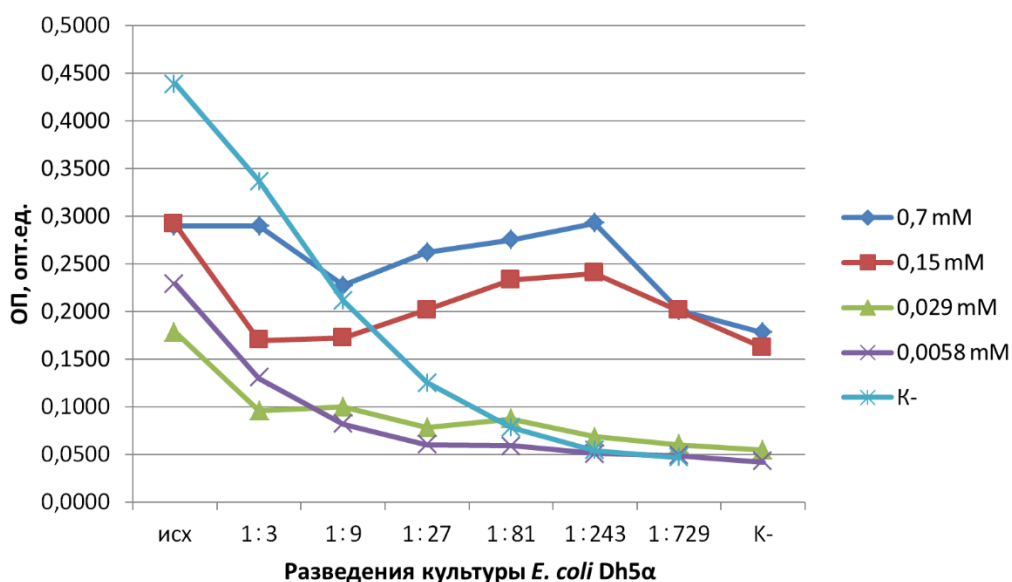


Рисунок 7 – Кривые роста культуры *E. coli* Dh5α при воздействии разных концентраций пептида КК-46 (n = 3)

На графике показано, что пептид КК-46 был способен ингибировать рост бактерий на 33,6-59,4 % при исходной концентрации бактериальной культуры. Следует отметить, что было зафиксировано увеличение оптической плотности питательной среды в присутствии высоких концентраций пептида (0,7 и 0,15 mM). Выдвинуто предположение, что это связано с ограниченной растворимостью КК-46 и, как следствие, его пребывании в растворе во взвешенном состоянии, что проявляется в помутнении раствора. Для концентраций 0,029 и 0,0058 mM такого эффекта не наблюдалось. При определении МИК было проанализировано влияние пептида КК-46 на рост бактериальной культуры в двух минимальных концентрациях, которые не влияли на ОП (0,029 и 0,0058 mM). МИК для пептида КК-46 составила 0,029 mM. Сводная таблица значений МИК представлена ниже (таблица 10).

Таблица 10 – Минимальная ингибирующая концентрация катионных пептидов

Шифр	Последовательность	М, г/моль	Заряд рН 7	МИК, mM
A-69	KIAKRIWKILRRR	1737	8	1,15
ST-10	(KKLRLKTAFK) ₂ KAC-NH ₂	2749	12	0,14
КК-46	(R ₂ KWTPEV) ₄ K ₂ H ₂ KFC-NH ₂	5140	12	0,029

Подобное увеличение оптической плотности в присутствии высоких концентраций вещества было зафиксировано и для других пептидов, например, АВ-14, АВ-17 и АВ-18, что делает невозможным оценку антибактериальной активности и определение МИК данных веществ методом серийных микроразведений. В результате значения МИК были получены только для трех катионных пептидов (А-69, ST-10 и КК-46), поскольку они не оказывали влияния на ОП питательного бульона.

Чтобы оценить антибактериальную активность пептидов, для которых не были определены значения МИК, было принято решение использовать такой

метод оценки, как метод подсчета колоний с последующим расчетом минимальной бактерицидной концентрации.

3.2.1.3 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов методом подсчета колоний

С помощью метода подсчета колоний была определена минимальная бактерицидная концентрация катионных пептидов, то есть наименьшая концентрация, вызывающая гибель 99,9 % микроорганизмов от исходного уровня. Бактерицидная активность была изучена для наиболее активных и перспективных для синтеза катионных пептидов, а именно КК-46, ПД, ST-10, А69, АВ-4, АВ-14, АВ-17, АВ-18. На рисунке 8 представлены результаты анализа бактерицидной активности пептида КК-46.

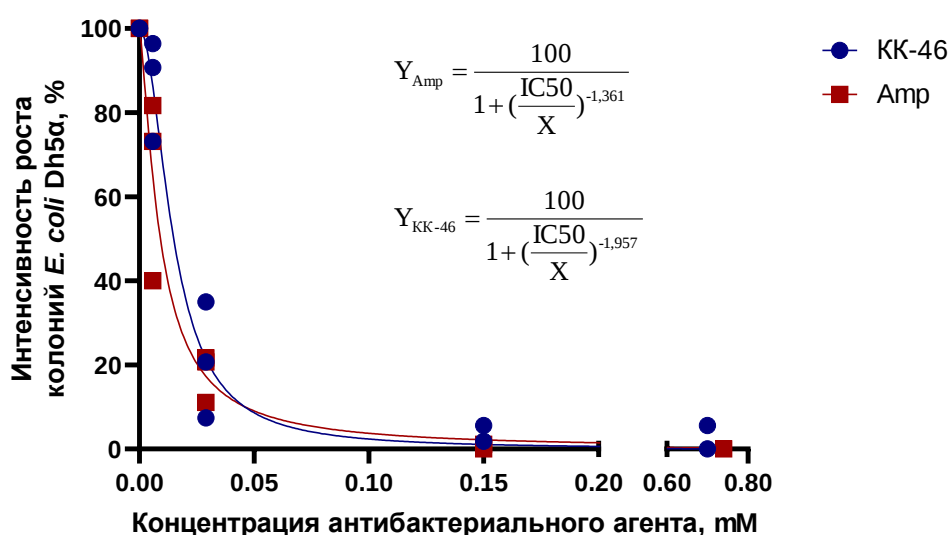


Рисунок 8 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида КК-46 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Показано, что пептид КК-46 обладал бактерицидной активностью, сопоставимой с таковой контрольного антибиотика ампициллина. Минимальная бактерицидная концентрация КК-46 в отношении штамма *E. coli* Dh5α составила 0,1566 мМ. При этом уровень проявленной пептидом КК-46 активности был

несколько выше уровня активности положительного контроля (МБК ампициллина составила 0,2685 mM).

На рисунке 9 показана антибактериальная активность пептида ПД.

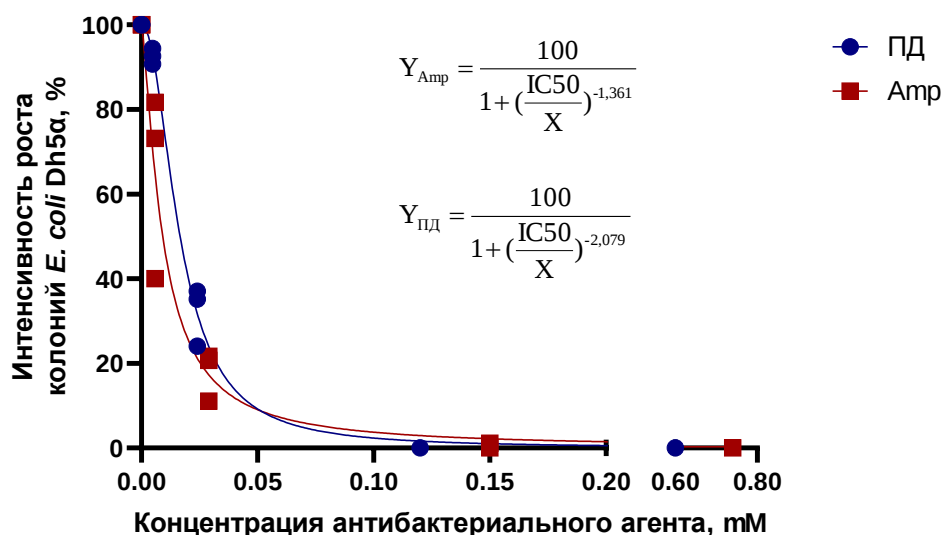


Рисунок 9 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида ПД и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Исследования показали, что пептид ПД обладал выраженной бактерицидной активностью в отношении штамма *E. coli* Dh5α. Данный пептид вызывал гибель 99,9 % микроорганизмов при концентрации 0,1518 mM (МБК), в то время как эффективность контрольного антибиотика была ниже, поскольку при соответствующей дозе ампициллина регистрировали единичные колонии кишечной палочки.

Далее, на рисунке 10 представлена активность пептида ST-10.

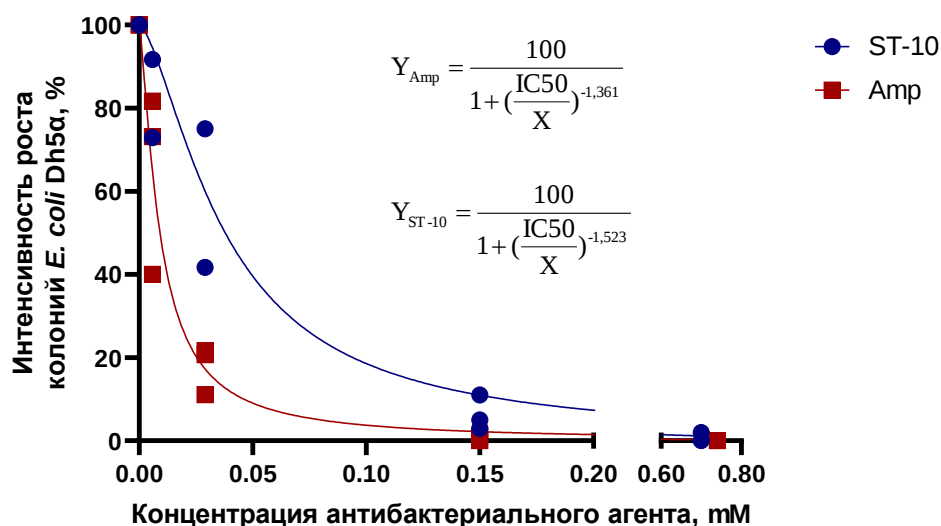


Рисунок 10 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида ST-10 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Было показано, что дендримерный пептид ST-10 обладал бактерицидной активностью в отношении штамма *E. coli* Dh5α. МБК для данного пептида составила 0,7740 mM. Уровень проявленной пептидом ST-10 активности был несколько ниже относительно контрольного образца (ампициллин).

На рисунке 11 представлена бактерицидная активность пептида A-69.

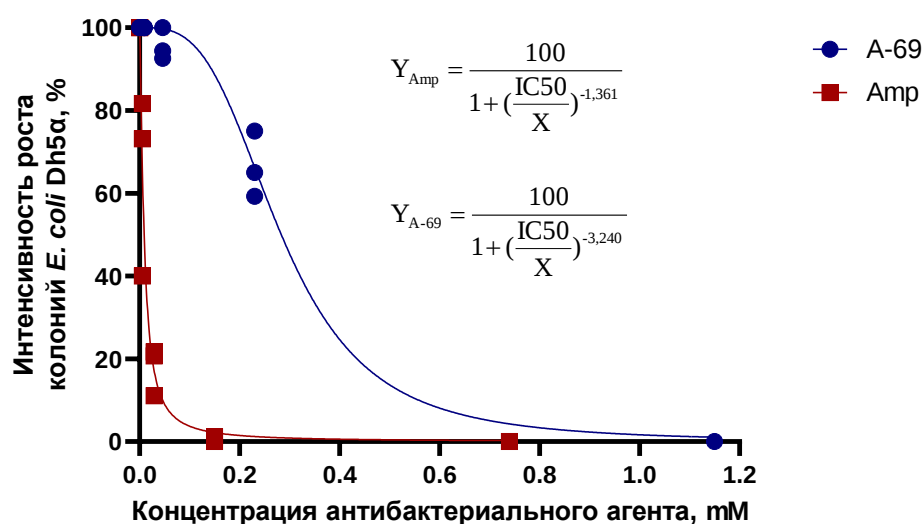


Рисунок 11 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида A-69 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

МБК для пептида А-69 составила 1,1708 mM. При этом, в концентрации 0,23 mM (в пять раз ниже бактерицидной) пептид А-69 не показал какой-либо существенной активности в отношении бактериальной культуры, что указывает на очень узкий рабочий диапазон концентраций.

Далее, нами была изучена бактерицидная активность пептида АВ-4 (рисунок 12).

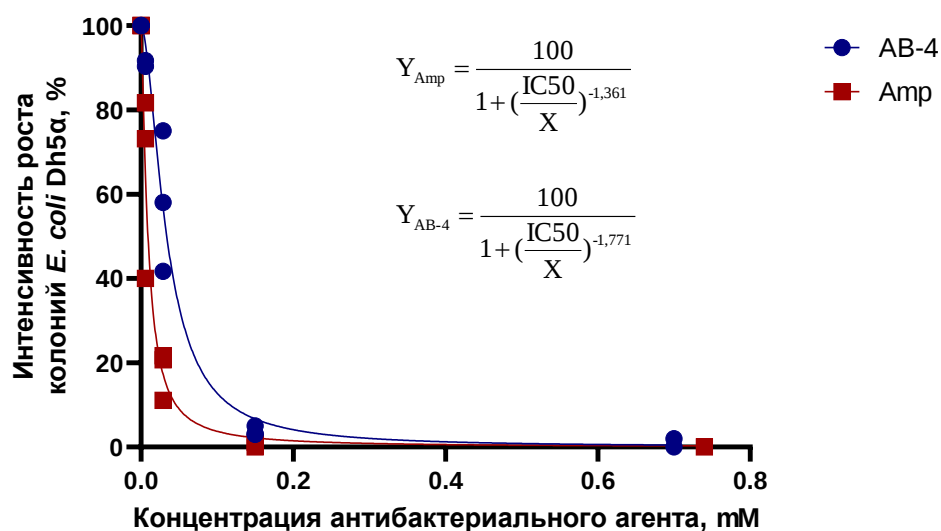


Рисунок 12 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида АВ-4 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

На представленном графике видно, что пептид АВ-4 проявлял существенную бактерицидную активность (МБК составила 0,4528 mM). При этом активность данного пептида была несколько выше по сравнению с контрольным антибиотиком ампициллином, МБК которого составляла 0,2685 mM.

На рисунке 13 представлена бактерицидная активность пептида АВ-14. Фотографии чашек Петри с индивидуальными колониями *E. coli* Dh5α через 24 часа после тестирования антибактериальной активности АВ-14 (рисунок 14А) в сравнении с антибиотиком ампициллином (рисунок 14Г) отобраны в качестве примера для иллюстрации результатов исследования бактерицидной активности методом подсчета колоний.

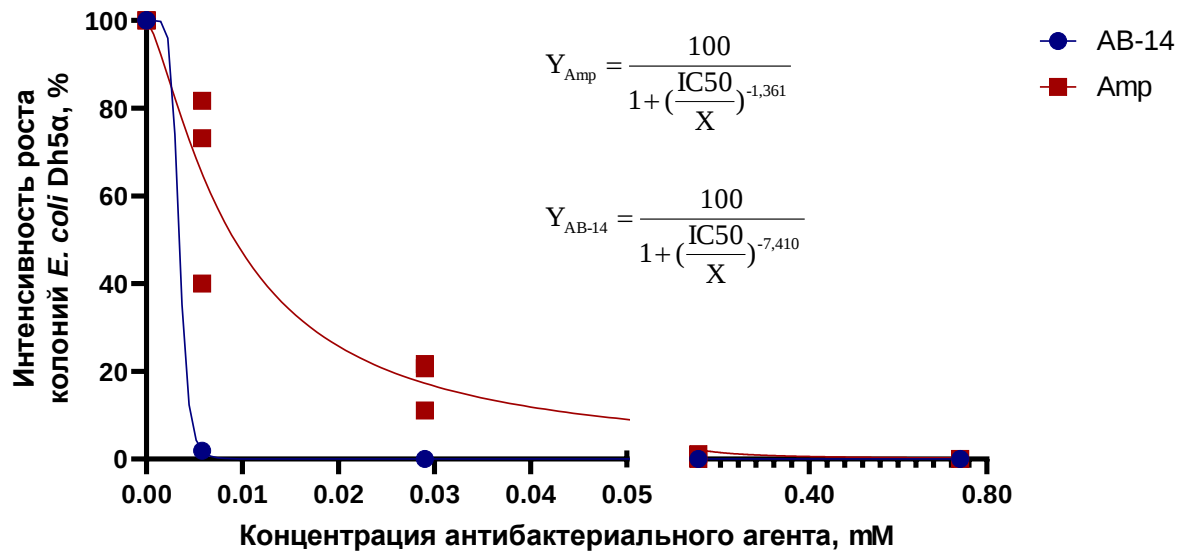


Рисунок 13 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида АВ-14 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

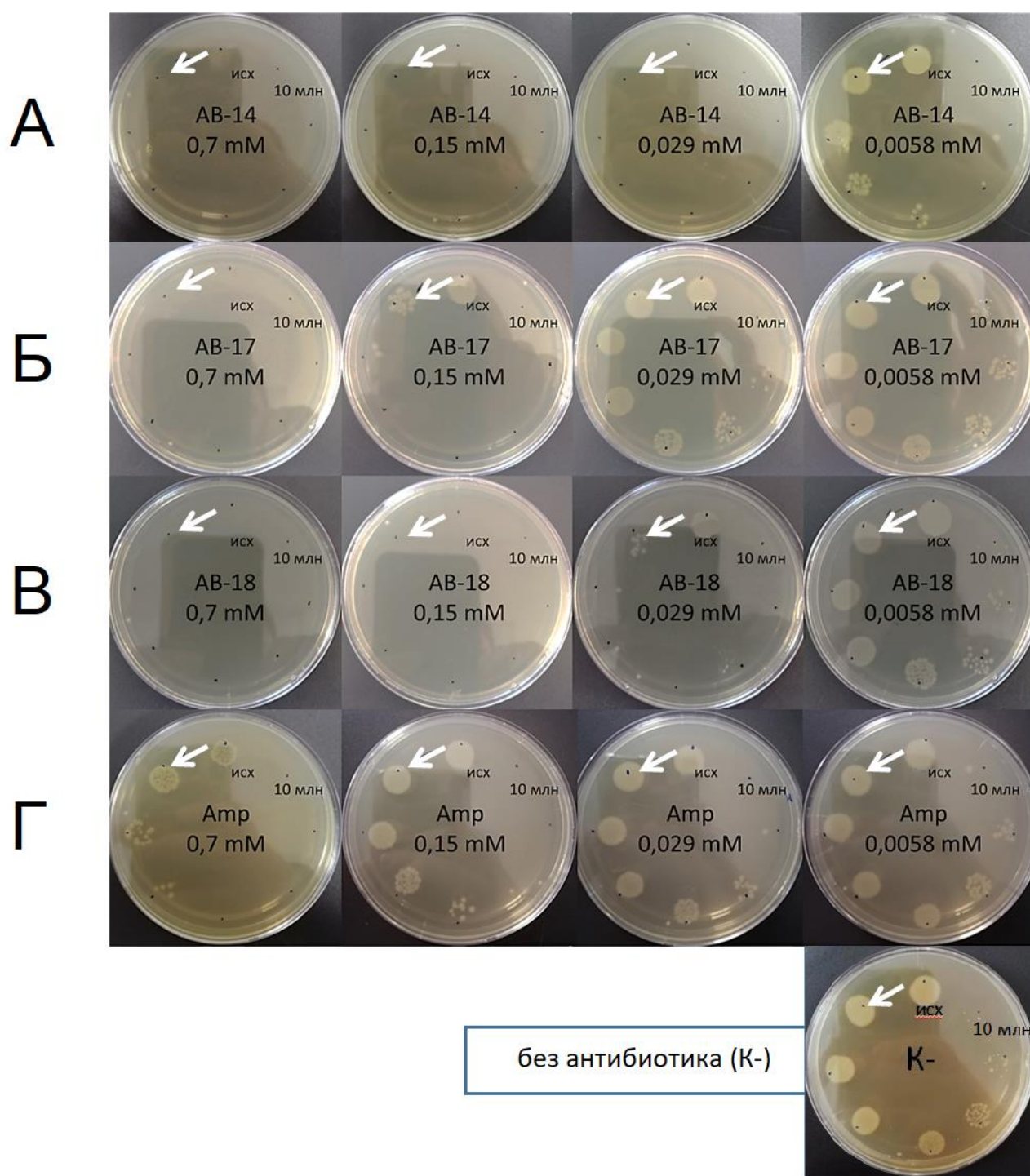


Рисунок 14 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *E. coli* Dh5 α методом подсчета колоний. А – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-14 в концентрациях 0,7 mM, 0,15 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; Б – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-17 в концентрациях 0,74 mM, 0,15 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; В – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-18 в концентрациях 0,74 mM, 0,15 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; Г – инкубация бактериальной суспензии в присутствии ампициллина в

концентрациях 0,74 mM, 0,15 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM (положительный контроль, «Amp») и в отсутствие антибактериального агента (отрицательный контроль, «К-»). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↺» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Катионный пептид АВ-14 продемонстрировал бактерицидную активность в отношении *E. coli* Dh5α в концентрации 0,0063 mM. Таким образом, МБК для АВ-14 был выше таковой положительного контроля (ампициллин) в 43 раза.

На рисунках 15 и 14Б представлены данные относительно бактерицидной активности катионного пептида АВ-17.

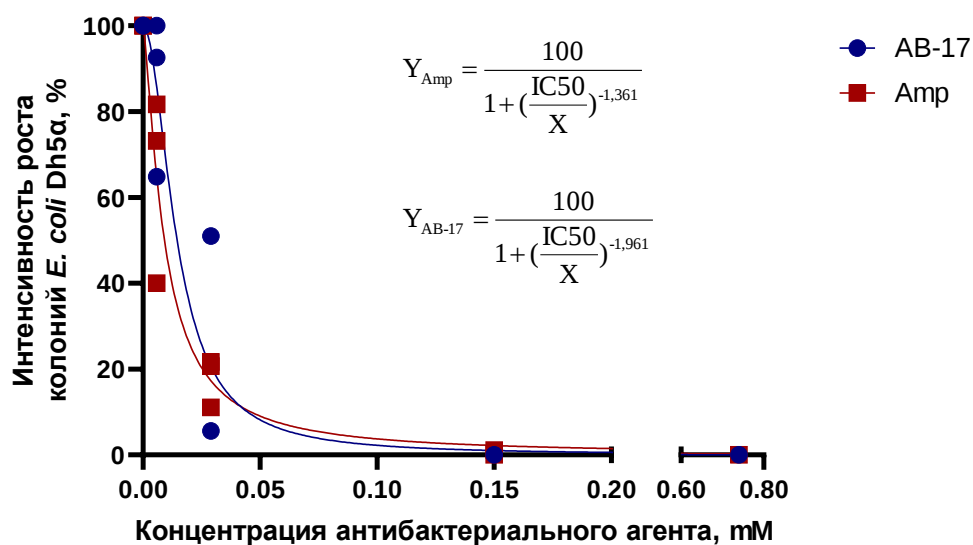


Рисунок 15 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида АВ-17 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

МБК для АВ-17 составила 0,1517 mM, что было выше таковой положительного контроля. Подавление роста бактериальной культуры под действием АВ-17 в концентрации 0,1517 mM наблюдалось при общем микробном числе $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а при обработке ампициллином в той же концентрации – только при общем микробном числе в 10 раз меньше.

На рисунках 16 и 14В представлена антибактериальная активность пептида АВ-18.

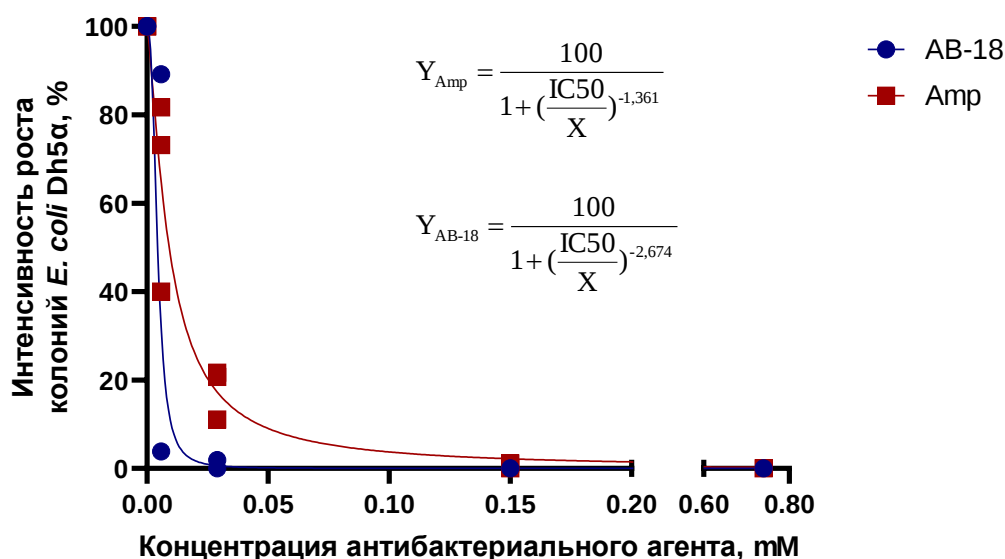


Рисунок 16 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций пептида АВ-18 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

МБК АВ-18 в отношении *E. coli* Dh5α составила 0,0245 мМ и превосходила таковую положительного контроля в 11 раз. В то время как пептид АВ-18 ингибировал рост бактериальной культуры при общем микробном числе $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в концентрации 0,0245 мМ, антибиотик показал сопоставимый уровень бактерицидной активности только в концентрации в 5 раз больше и при общем микробном числе $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

На основании полученных данных был составлен график сравнительного анализа антибактериальной активности исследованных катионных пептидов с наиболее выраженной бактерицидной активностью (рисунок 17).

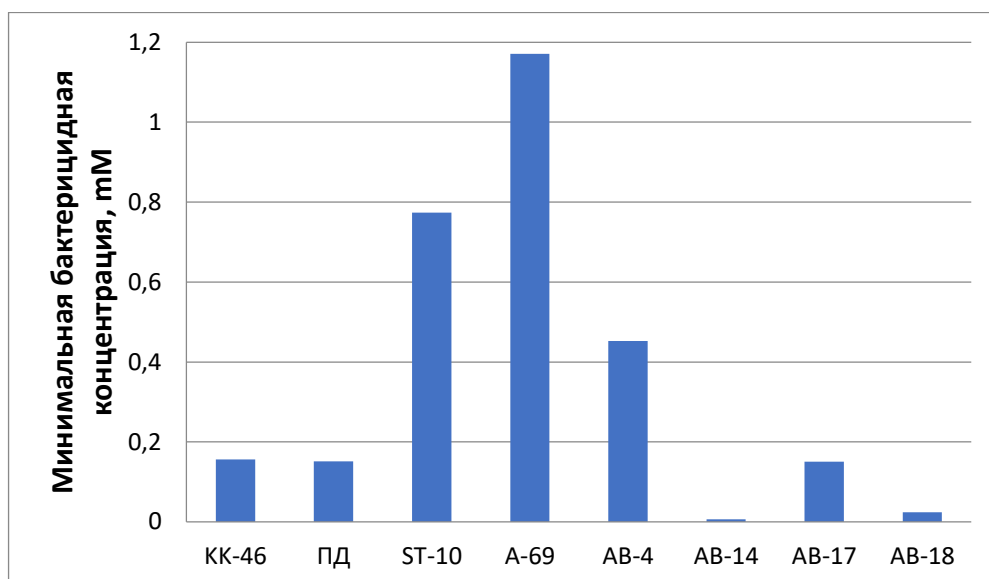


Рисунок 17 – Сравнительный анализ бактерицидной активности катионных пептидов KK-46, ПД, ST-10, A-69, АВ-4, АВ-14, АВ-17, АВ-18 в отношении *E. coli* Dh5α. Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

На графике видно, что наименьшие значения МБК были выявлены у пептидов АВ-14, АВ-17 и АВ-18 (0,0063 mM, 0,1517 mM и 0,0245 mM, соответственно). В ходе оценки бактерицидной активности A-69 и АВ-4 был выявлен очень узкий диапазон рабочих концентраций пептидов, что является нежелательным обстоятельством для терапевтических препаратов, поэтому указанные пептиды были признаны не перспективными и далее не изучались. Активность пептида P-148-Cys (ПД) была сопоставима с активностью АВ-17, однако из дальнейших исследований P-148-Cys (ПД) был также исключен, поскольку длина пептида была велика (25 аминокислотных остатков), вследствие чего его синтез был крайне сложен и плохо воспроизводим. Таким образом, нами было принято решение продолжить изучение активности пептидов KK-46, ST-10, АВ-14, АВ-17, АВ-18 ввиду их выраженной бактерицидной активности.

3.2.2 Оценка антибактериальной активности катионных пептидов в отношении штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки

Для дальнейшего изучения антибактериальной активности противомикробных пептидов АВ-14, АВ-17 и АВ-18 было принято решение расширить спектр патогенных микроорганизмов. Исследование проводили с использованием патогенных штаммов с множественной лекарственной резистентностью грам-отрицательных бацилл, не принадлежащих порядку *Enterobacterales* (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), грам-отрицательных бацилл порядка *Enterobacterales* (*K. pneumoniae* и *E. coli*), и грам-положительных кокков (*S. aureus* и *S. agalactiae*).

Прежде всего, мы изучили активность катионного пептида АВ-17, похожего по структуре на АВ-18, но имеющего в 5 раз меньшую бактерицидную активность против *E. coli* Dh5 α , в отношении патогенных нерезистентных штаммов кишечной палочки (*E. coli* 4sR, 4sI, 4s), чтобы оценить перспективы для практического применения наименее эффективного пептида из триады (АВ-14, АВ-17, АВ-18). Антибактериальная активность АВ-17 в отношении *E. coli* 4sR, 4sI, 4s была сопоставима с таковой против *E. coli* Dh5 α , а значение МБК составило 0,14 mM (таблица 11).

Таблица 11 – Антибактериальная активность катионных пептидов, определенная методом диффузии в агар, в отношении патогенных штаммов *E. coli*. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Вид микроорганизма	Штамм	Минимальная бактерицидная концентрация, mM			
		Ампициллин	AB-14	AB-17	AB-18
<i>E. coli</i>	4sR	0,7	0,14	0,14	0,14
	4sI	0,7	0,14	0,14	0,14
	4s	-	0,14	0,14	0,14
	МЛУ	-	0,029	-	0,118

Получив данный результат, мы решили изучить активность пептидов с более выраженной бактерицидной активностью в отношении *E. coli* Dh5 α , чем у AB-17, а именно AB-14 и AB-18, на примере патогенных нерезистентных и полирезистентного штаммов *E. coli* (таблица 11).

МБК пептидов AB-14 и AB-18 в отношении *E. coli* 4S (природный изолят с нормальным О-антигеном), 4SI (мутантный штамм с укороченным О-антигеном) и 4SR (мутантный штамм без О-антигена) составила 0,14 mM и была выше таковой положительного контроля, в качестве которого использовали ампициллин (0,7 mM). При этом природный изолят кишечной палочки с нормальным О-антигеном (4S) обладал устойчивостью к данному антибиотику.

Далее было проведено исследование антибактериальной активности на штамме *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью. Бактерии данного штамма были частично устойчивы к имипенему и полностью устойчивы к цефотаксиму, левофлоксацину, гентамицину, смеси триметоприм/сульфаметокс, смеси амоксициллин/клавуланат, цефтазидиму, меропенему, амикацину и ципрофлоксацину (таблица 12).

Таблица 12 – Устойчивость штамма *E. coli* с МЛУ к наиболее широко применяемым антибиотикам. Общее микробное число составляло 10^7 КОЕ/мл

Антибиотик	МИК, мкг/мл	S-I-R*
Имипенем, 10 мкг	6	I
Цефотаксим, 5 мкг	6	R
Левифлоксацин, 5 мкг	6	R
Гентамицин, 10 мкг	6	R
Триметоприм/сульфаметокс, 1,25 мкг + 23,75 мкг	6	R
Амоксициллин/клавуланат, 20 мкг + 10 мкг	6	R
Цефтазидим, 10 мкг	6	R
Меропенем, 10 мкг	6	R
Амикацин, 30 мкг	6	R
Ципрофлоксацин, 5 мкг	6	R

* Стратификация штамма S-I-R по степени чувствительности к антимикробным препаратам, где S – чувствительный к препарату; I – чувствительный при увеличенной экспозиции препарата; R – устойчивый к препарату.

На рисунке 18 представлена бактерицидная активность пептида АВ-18 в отношении полирезистентного штамма *E. coli*.

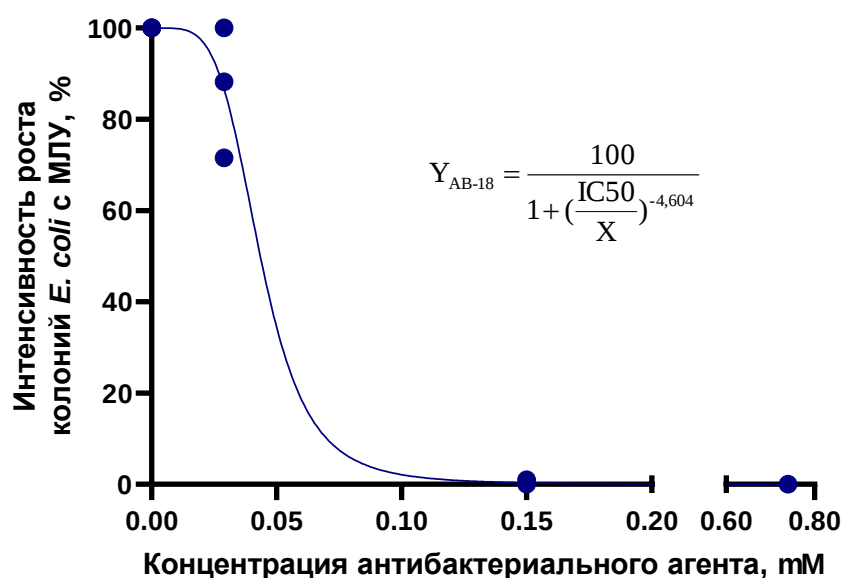


Рисунок 18 – Активность роста полирезистентного штамма *E. coli* в присутствии разных концентраций пептида АВ-18 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

В результате исследований было выявлено, что пептиды АВ-14 и АВ-18 обладали выраженной бактерицидной активностью в отношении штамма кишечной палочки с МЛУ (МБК составили 0,029 и 0,118 мМ, соответственно), а пептид АВ-17 не обладал способностью подавлять рост бактерий данного штамма (рисунок 19). Важно отметить, что для данного штамма *E. coli* не был подобран положительный контроль ввиду его множественной лекарственной устойчивости к ряду классических антибактериальных препаратов.

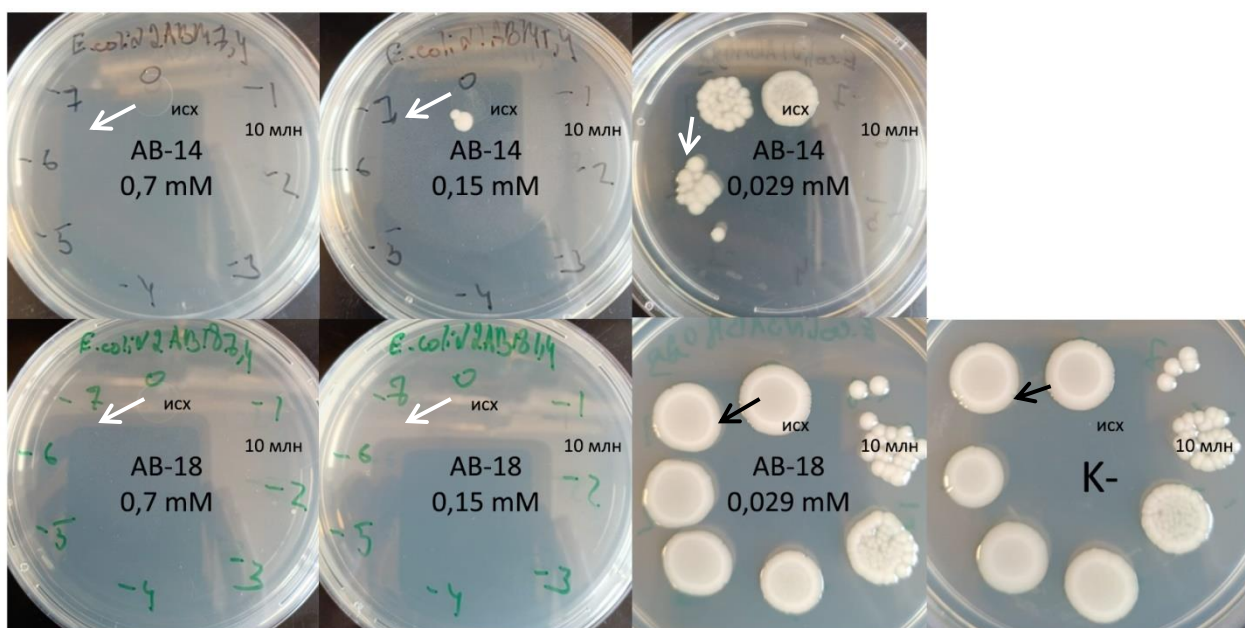


Рисунок 19 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *E. coli* с МЛУ методом подсчета колоний. «АВ-14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-14 в концентрациях 0,7 мМ, 0,15 мМ и 0,029 мМ; «АВ-18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-18 в концентрациях 0,74 мМ, 0,15 мМ и 0,029 мМ; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 мл» - разведение бактериальной культуры 1:100000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Поскольку АВ-17 не проявлял бактерицидную активность в отношении полирезистентного штамма *E. coli*, далее оценка активности против других видов

бактерий, в том числе штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, проводилась для пептидов АВ-14 и АВ-18 (таблица 13).

Таблица 13 – Антибактериальная активность катионных пептидов, определенная методом диффузии в агар, в отношении клинически значимых патогенных микроорганизмов. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Вид микроорганизма	Штамм	Минимальная бактерицидная концентрация, mM		
		Канамицин	AB-14	AB-18
<i>P. aeruginosa</i>	РАО	0,7	0,7	0,14
	МЛУ	-	0,7	0,14
Вид микроорганизма		AB-14		AB-18
<i>S. aureus</i>		0,7		0,14
Вид микроорганизма		AB-14		AB-18
<i>S. agalactiae</i>		0,14		0,14
Вид микроорганизма		Канамицин	AB-14	AB-18
<i>K. pneumoniae</i>		0,7	0,029	0,0736
Вид микроорганизма		AB-14		
<i>A. baumannii</i>		0,029		

Была проведена оценка бактерицидной активности пептидов АВ-14 и АВ-18 в отношении двух штаммов синегнойной палочки (*P. aeruginosa*) – РАО и штамма с МЛУ. Синегнойная палочка является одним из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций, в частности гнойных хирургических инфекций, в связи с чем препараты, обладающие активностью в отношении данного клинически значимого патогена, особенно востребованы. Выявлено, что

пептиды АВ-14 и АВ-18 обладали бактерицидной активностью в отношении *P. aeruginosa* РАО (МБК составили 0,7 и 0,14 мМ, соответственно) на уровне положительного контроля (0,7 мМ) или выше такового. Изолят *P. aeruginosa* РАО был выделен из раны пациента в Мельбурне, Австралия, в 1954 году [66] и сохранил чувствительность к канамицину, который был выбран в качестве положительного контроля.

Бактерицидную активность АВ-14 и АВ-18 также оценивали в отношении штамма синегнойной палочки, частично устойчивого к цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, имипенему, резистентного к пиперациллину, тобрамицину, амикацину, цiproфлоксацину, тикарциллину и меропенему (таблица 14).

Таблица 14 – Устойчивость штамма *P. aeruginosa* с МЛУ к наиболее широко применяемым антибиотикам. Общее микробное число составляло 10^6 КОЕ/мл

Антибиотик	МИК	S-I-R*
Пиперациллин, 30 мкг	16	R
Цефтазидим, 10 мкг	21	I
Цефепим, 30 мкг	22	I
Тобрамицин, 10 мкг	6	R
Амикацин, 30мкг	6	R
Цiproфлоксацин, 5 мкг	6	R
Тикарциллин, 75 мкг	12	R
Азтреонам, 30 мкг	20	I
Имипенем, 10 мкг	20	I
Меропенем, 10 мкг	6	R
Левифлоксацин, 5 мкг	6	R

* Стратификация штамма S-I-R по степени чувствительности к антимикробным препаратам, где S – чувствительный к препарату; I – чувствительный при увеличенной экспозиции препарата; R – устойчивый к препарату.

Пептиды АВ-14 и АВ-18 обладали выраженной антибактериальной активностью в отношении *P. aeruginosa* с МЛУ, МБК для них составили 0,7 и 0,14 мМ, соответственно, в то время как положительный контроль для данного штамма бактерий не был подобран ввиду его множественной устойчивости.

В ходе исследований была установлена бактерицидная активность пептидов АВ-14 и АВ-18 в отношении другого вида условно-патогенных бактерий - *S. aureus*. *S. aureus* – наиболее агрессивный и распространенный вид рода *Staphylococcus*, вызывающий широкий диапазон заболеваний, в частности кожные инфекции и синдром токсического шока, вследствие чего востребован при изучении антибактериальной активности различных препаратов. В данной работе были рассчитаны МБК исследуемых пептидов в отношении *S. aureus*, которые составили 0,7 mM для АВ-14 и 0,14 mM для АВ-18 (рисунок 20).

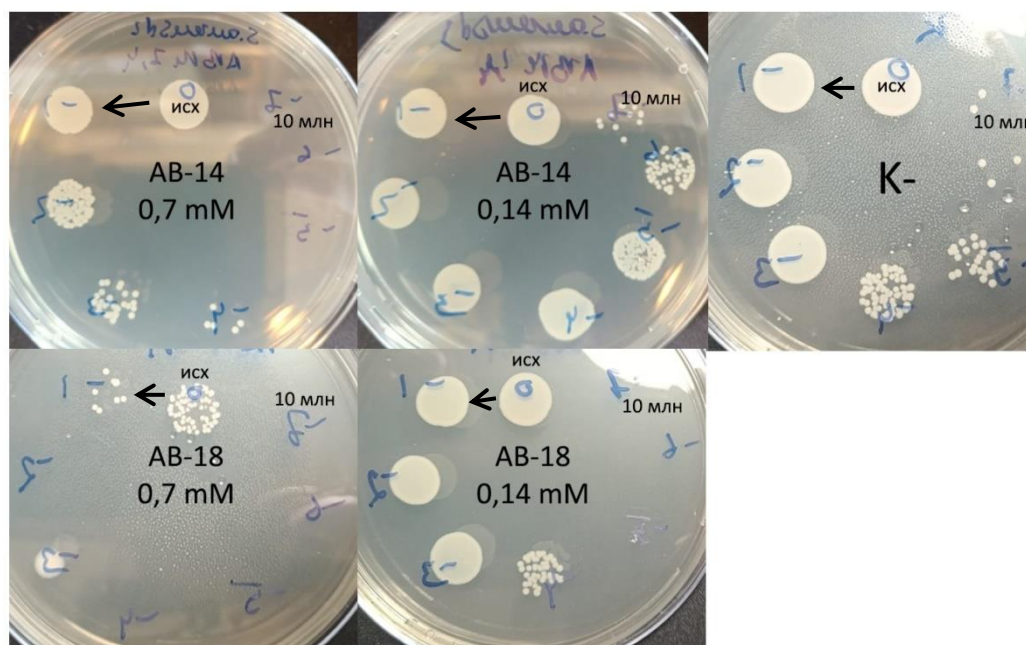


Рисунок 20 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *S. aureus* методом подсчета колоний. «АВ-14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-14 в концентрациях 0,7 mM и 0,14 mM; «АВ-18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-18 в концентрациях 0,74 mM и 0,14 mM; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл

Затем бактерицидную активность АВ-14 и АВ-18 оценивали в отношении бактерий вида *S. agalactiae*, являющегося наиболее распространенным возбудителем класса стрептококков у человека. Представлен спектр устойчивости данного штамма к антибиотикам и бактериофагам (таблица 15).

Таблица 15 – Устойчивость штамма *S. agalactiae* с МЛУ к наиболее широко применяемым антибиотикам и фагам. Общее микробное число составляло 10^6 КОЕ/мл

Антибактериальный агент	МИК	S-I-R*
Секстафаг (пиобактериофаг поливалентный)		R
Пиобактериофаг комплексный		R
Бактериофаг стрептококковый		R
Моксифлоксацин, 5 мкг	22	S
Бензилпенициллин, 0,6 мкг	21	S
Тетрациклин, 30 мкг	15	R
Левифлоксацин, 5 мкг	19	I
Эритромицин, 15 мкг	10	R
Клиндамицин, 2 мкг	6	R

* Стратификация штамма S-I-R по степени чувствительности к антимикробным препаратам, где S – чувствительный к препарату; I – чувствительный при увеличенной экспозиции препарата; R – устойчивый к препарату.

На рисунке 21 представлена бактерицидная активность АВ-14 против *S. agalactiae*. МБК для АВ-14 и АВ-18 в отношении *S. agalactiae* составила 0,14 mM (рисунки 22).

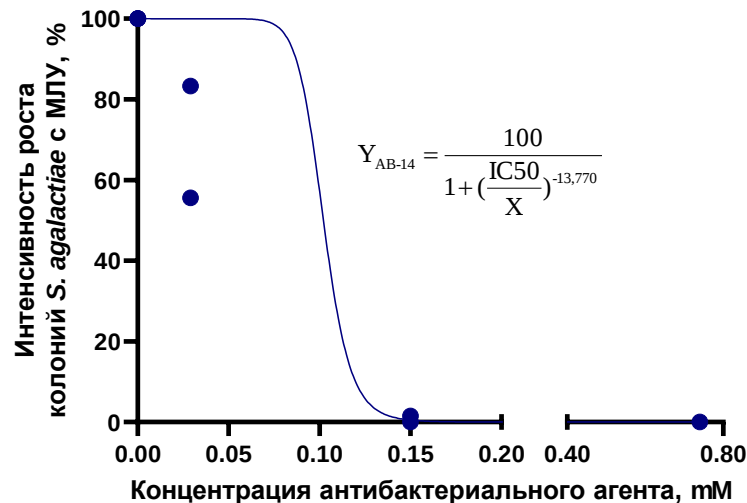


Рисунок 21 – Активность роста полирезистентного штамма *S. agalactiae* в присутствии разных концентраций пептида АВ-14 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

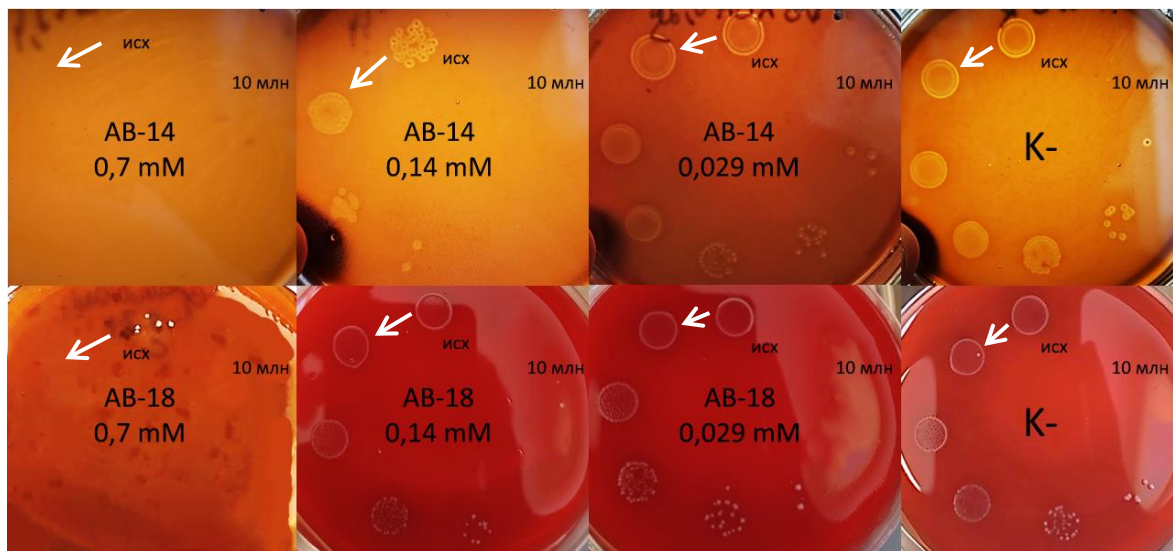


Рисунок 22 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *S. agalactiae* методом подсчета колоний. «АВ-14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «АВ-18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-18 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл

Еще одним видом бактерий, в отношении которого оценивали бактерицидную активность пептидов, был вид *K. pneumoniae*. Для оценки бактерицидной активности тестируемых соединений был выбран штамм с множественной лекарственной устойчивостью. Антибиотикограмма данного штамма представлена в таблице 16.

Таблица 16 – Устойчивость штамма *K. pneumoniae* с МЛУ к наиболее широко применяемым антибиотикам. Общее микробное число составляло 10^6 КОЕ/мл

Антибиотик	МИК	S-I-R*
Имипенем, 10 мкг	19	I
Цефотаксим, 5 мкг	6	R
Ампициллин, 10 мкг	6	R
Левифлоксацин, 5 мкг	6	R
Гентамицин, 10 мкг	6	R
Триметоприм\сульфаметокс, 1,25 мкг + 23,75 мкг	6	R
Цефепим, 30 мкг	9	R
Амоксициллин\клавуланат, 20 мкг + 10 мкг	11	R
Цефтазидим, 10 мкг	6	R
Меропенем, 10 мкг	14	R
Амикацин, 30 мкг	6	R
Ципрофлоксацин, 5 мкг	6	R

* Стратификация штамма S-I-R по степени чувствительности к антимикробным препаратам, где S – чувствительный к препарату; I – чувствительный при увеличенной экспозиции препарата; R – устойчивый к препарату.

На рисунке 23 показана активность АВ-18 в отношении *K. pneumoniae*. На рисунке 24 представлены колонии *K. pneumoniae* после инкубации с различными концентрациями пептидов АВ-14 и АВ-18.

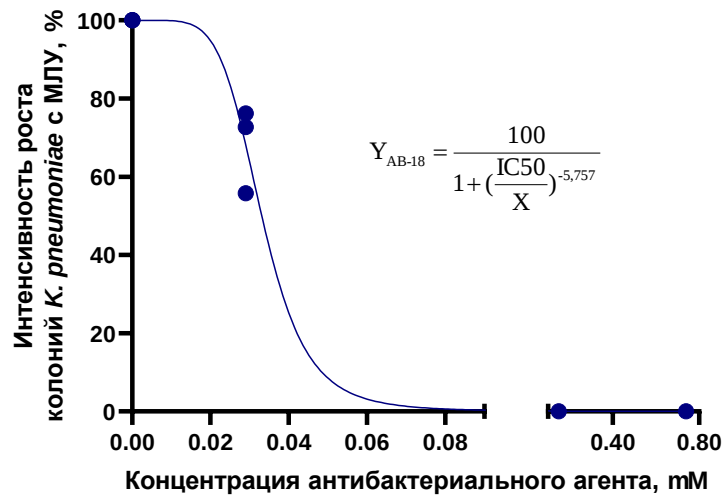


Рисунок 23 – Активность роста полирезистентного штамма *K. pneumoniae* в присутствии разных концентраций пептида АВ-18 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

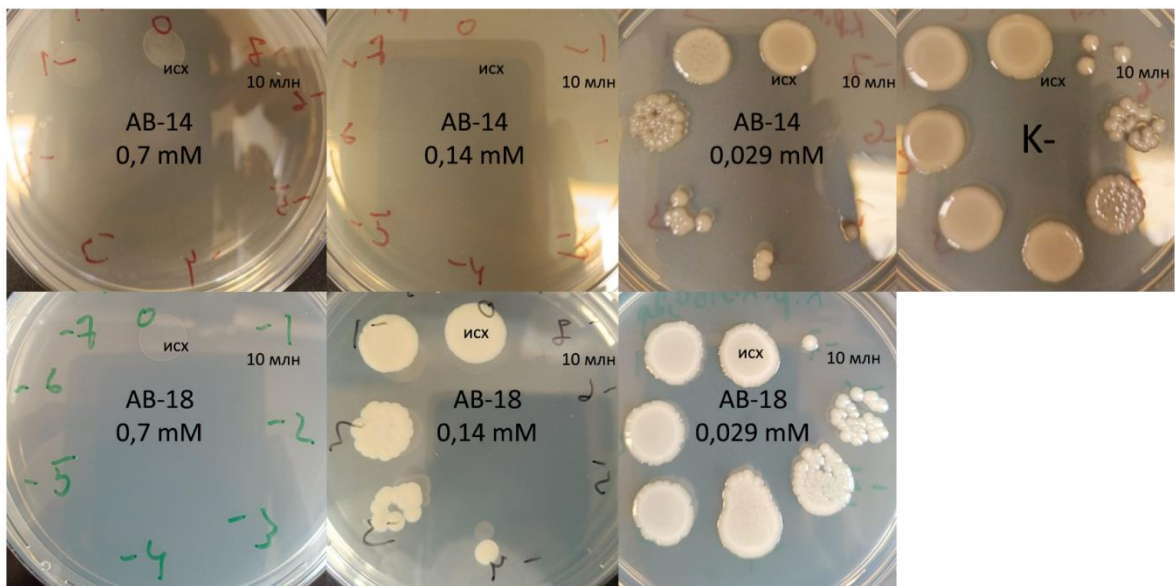


Рисунок 24 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *K. pneumoniae* с МЛУ методом подсчета колоний. «АВ-14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «АВ-18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии АВ-18 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Пептиды АВ-14 и АВ-18 проявляли более выраженную бактерицидную активность в отношении данного патогена по сравнению с контрольным антибиотиком канамицином. МБК пептидов составили 0,029 mM и 0,0736 mM, соответственно.

Далее была проведена оценка бактерицидной активности пептида АВ-14 в отношении *A. baumannii*. *A. baumannii* – это аэробная, неферментирующая, грам-отрицательная, палочковидная бактерия, способная колонизировать кожу, конъюнктиву, полость рта, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и мочеполовой тракт здоровых людей. Данный вид микроорганизмов является одним из основных патогенов, вызывающих оппортунистические нозокомиальные инфекции, включая раневые инфекции, инфекции центральной нервной системы, брюшной полости, мочевыводящих путей и бактериемию у пациентов с ослабленным иммунитетом. В ходе работы использовали полирезистентный штамм *A. baumannii* (таблица 17).

Таблица 17 – Устойчивость штамма *A. baumannii* с МЛУ к наиболее широко применяемым антибиотикам. Общее микробное число составляло 10^6 КОЕ/мл

Антибиотик	МИК	S-I-R*
Амикацин, 30 мкг	19	S
Имипенем, 10 мкг	6	R
Левифлоксацин, 5 мкг	6	R
Тобрамицин, 10 мкг	23	S
Ципрофлоксацин, 5 мкг	6	R
Меропенем, 10 мкг	6	R
Гентамицин, 10 мкг	24	S
Триметоприм\сульфаметокс, 1,25 мкг + 23,75 мкг	6	R

* Стратификация штамма S-I-R по степени чувствительности к антимикробным препаратам, где S – чувствительный к препарату; I – чувствительный при увеличенной экспозиции препарата; R – устойчивый к препарату.

Минимальная бактерицидная активность пептида АВ-14 в отношении *A. baumannii* составила 0,029 mM (рисунок 25).

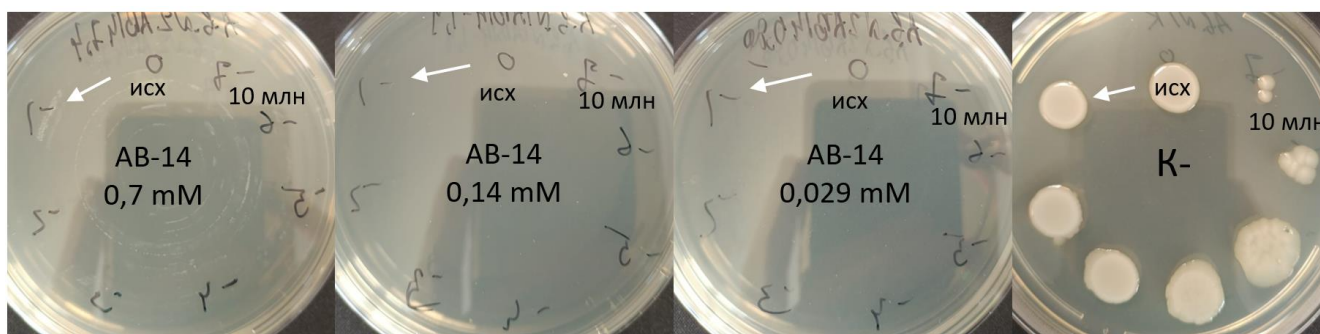


Рисунок 25 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *A. baumannii* с МЛУ методом подсчета колоний. «AB-14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии AB-14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Таким образом, в ходе исследований было продемонстрировано, что пептиды AB-14, AB-17 и AB-18 обладают выраженной активностью в отношении спектра патогенных клинически значимых микроорганизмов (рисунок 26).

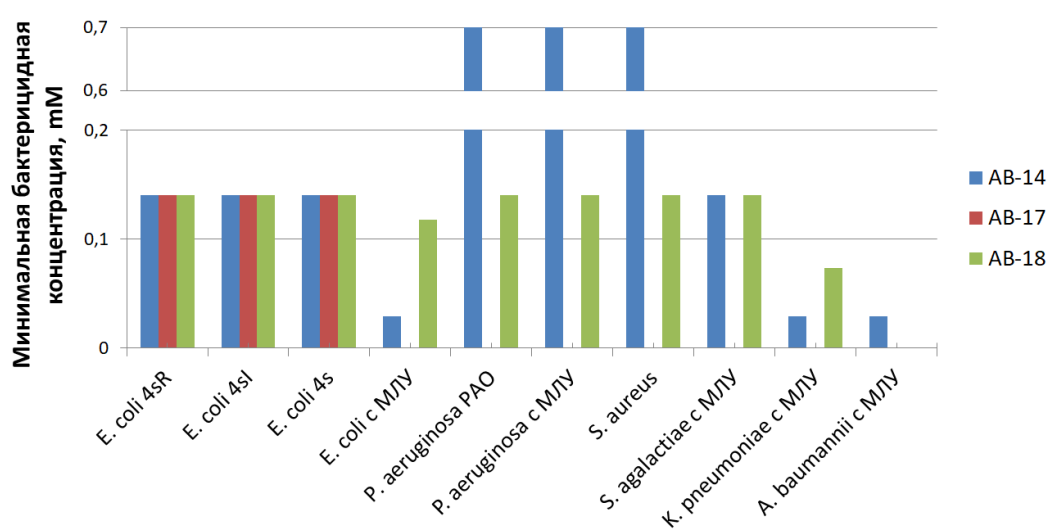


Рисунок 26 – Антибактериальная активность катионных пептидов AB-14, AB-17, AB-18 в отношении клинических значимых видов бактерий. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

МБК пептидов, прошедших тестирование на вышеупомянутых бактериальных культурах, были ниже МБК тех же пептидов для *E. coli* Dh5α и составляли преимущественно 0,7 и 0,14 mM. Предположительно, это связано с различиями между лабораторным и природными штаммами, а также особенностями строения клеточной стенки разных видов бактерий.

Полученные результаты демонстрируют выраженную спектроспецифичность катионных пептидов, зависящую от вида бактериального патогена и наличием у него фенотипа МЛУ. Наибольший потенциал пептида АВ-14 был выявлен в отношении грам-отрицательных МЛУ-патогенов, в то время как пептид АВ-18 был наиболее активен против *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Принципиальное различие между пептидами АВ-14 и АВ-18 заключается в профиле их минимальных бактерицидных концентраций: стабильность значений МБК АВ-18 для филогенетически разнородных бактерий (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. agalactiae*) позволяет выдвинуть гипотезу универсального механизма действия данного пептида, нацеленного на консервативную мишень. В то время как значительная вариабельность МБК АВ-14 указывает на высокоспецифичное действие, эффективное против определенных грам-отрицательных МЛУ-патогенов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*), но менее эффективное против других видов бактерий из-за их барьерных механизмов. Эти различия в профиле МБК являются ключевыми для понимания механизмов и оценки применимости пептидов.

Таким образом, на основе полученных результатов анализа антибактериальной активности в отношении лабораторного и патогенных штаммов микроорганизмов, пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18 были признаны перспективными для дальнейшего изучения, а именно исследования их цитотоксичности в отношении эукариотических клеток.

3.3 Изучение цитотоксичности катионных пептидов

Для оценки цитотоксической активности исследуемых соединений использовали МТТ-колориметрический метод определения. В классическом

варианте МТТ-теста определяли выживаемость клеток при различных дозах катионных пептидов с наиболее выраженной бактерицидной активностью, а именно КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18. Тест на жизнеспособность был проведен на линиях клеток Wi-38 (диплоидные фибробласты человека), A549 (аденокарцинома легкого человека), HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека) и mells (меланома человека). В результате полученных данных был рассчитан индекс цитотоксичности (IC_{50}) для данных соединений (таблица 18).

Таблица 18 – Цитотоксическая активность катионных антимикробных пептидов в отношении клеточных культур Wi-38, A549, HeLa и mells

Катионный пептид	IC_{50} , мкг/мл				
	Клеточная линия	Wi-38	A549	HeLa	mells
КК-46		174	187	283	341
ST-10		249	46	90	137
АВ-14		252,1	49	170	51
АВ-17		301	-	35	-
АВ-18		317	-	39,2	-

Наименее токсичными пептиды ST-10, АВ-14, АВ-18 оказались для линии нормальных клеток человека Wi-38. Пептид ST-10 показал наиболее выраженную токсичность в отношении клеточных линий A549 и HeLa (IC_{50} составил 46 и 90 мкг/мл соответственно), АВ-14 был токсичен в той же степени для A549 (IC_{50} составил 49 мкг/мл), а АВ-18 – в большей степени в отношении клеток линии HeLa (IC_{50} составил 39,2 мкг/мл). Пептид КК-46 был наименее токсичен для клеток меланомы человека mells (IC_{50} составила 341 мкг/мл) и наиболее токсичен для Wi-38 и A549 в равной степени (IC_{50} составили 174 и 187 мкг/мл). IC_{50} пептида АВ-17 была сопоставима с таковой для АВ-18 ввиду сходства их пептидных последовательностей (раздел 3.1.1.1). Таким образом, в результате оценки цитотоксической активности катионных пептидов КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18 на примере здоровых фибробластов легкого человека (Wi-38)

было выявлено, что они нетоксичны в диапазоне концентраций 20-174 мкг/мл. Данные скрининга цитотоксичности пептидов свидетельствуют о достаточно высоких значениях IC_{50} для использованных в исследовании клеточных линий, что делает КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18 пригодными для создания комбинированных соединений с фуллереном C60 и их дальнейшего изучения *in vivo*.

3.4 Получение комбинированных соединений

При разработке комбинированных на основе катионных пептидов и фуллерена C60 мы придерживались двух разных стратегий, направленных на получение конъюгатов (ASM-45 и ASM-46) и электростатических комплексов (K14, K17 и K18). В рамках первой стратегии на предварительном этапе была сконструирована платформа на основе фуллерена C60 (C60(Lys-MPA)_n), необходимая для дальнейшего присоединения катионных пептидов, поскольку, в отличие от, например, аминокислот, направленное точечное присоединение пептида к фуллерену по конкретной группе требует разработки специальных методов. С этой целью были выбраны катионные пептиды КК-46 и ST-10 с невысокой, относительно других полученных пептидов, бактерицидной активностью (МБК 0,1566 и 0,7740 mM, соответственно), чтобы впоследствии оценить степень влияния конъюгирования на активность молекул, входящих в состав комплекса. Таким образом, в результате конъюгирования платформы C60(Lys-MPA)_n с синтетическими катионными дендримерными пептидами КК-46 и ST-10 были получены конъюгаты K46, K46-2, ASM-38 и ASM-45 и ASM-40, ASM-46, соответственно.

Известно, что стандартизация конъюгатов представляет собой значительную методологическую сложность. Прежде всего, конъюгаты характеризуются выраженной структурной гетерогенностью, когда в рамках одной реакции образуется спектр соединений, различающихся по степени модификации (числу лигандов на носитель) и пространственной организации (изомеры, возникающие при конъюгации через разные активные центры). Также возможно образование

чувствительных к внешним условиям нестабильных связей, которые могут деградировать уже на этапе конъюгирования.

В связи с этим, использование платформы (C60(Lys-MPA)_n) также было необходимо для минимизации структурной неоднородности конъюгатов и позволило контролировать присоединение исключительно одной молекулы пептида. Так, для конъюгата ASM-45 молярное соотношение составило C60(Lys-MPA)₁₀(KK-46)₁ (весовое содержание пептида 16,7 %) при молекулярной массе 7642 Да, а для конъюгата ASM-46 – C60(Lys-MPA)₅(ST-10)₁ (весовое содержание пептида 18,6%) при молекулярной массе 5254 Да.

На рисунках 27 и 28 представлены ИК-спектр и УФ-вид-спектр ASM-45.

Для ASM-46 был получен типичный MALDI-TOF масс-спектр (рисунок 29) и типичный спектр поглощения в УФ и видимой областях (рисунок 30).

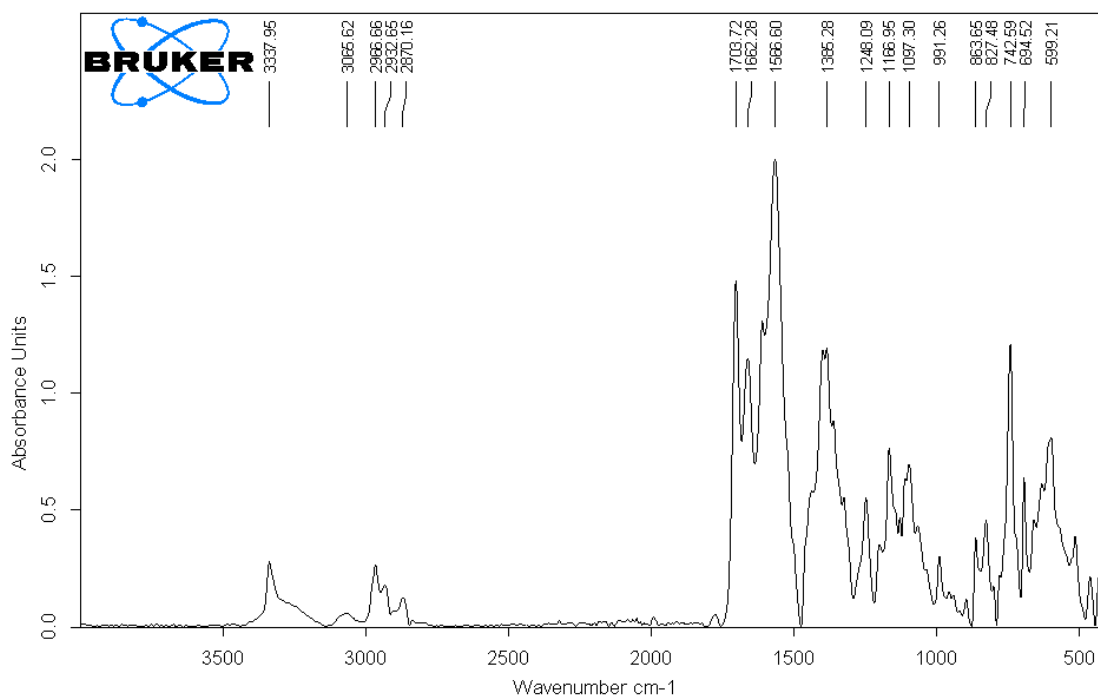


Рисунок 27 – Типичный ИК-Фурье спектр конъюгата ASM-45

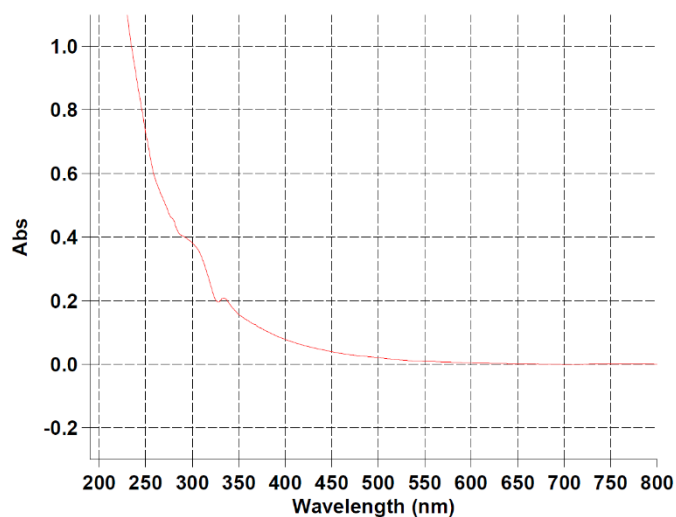
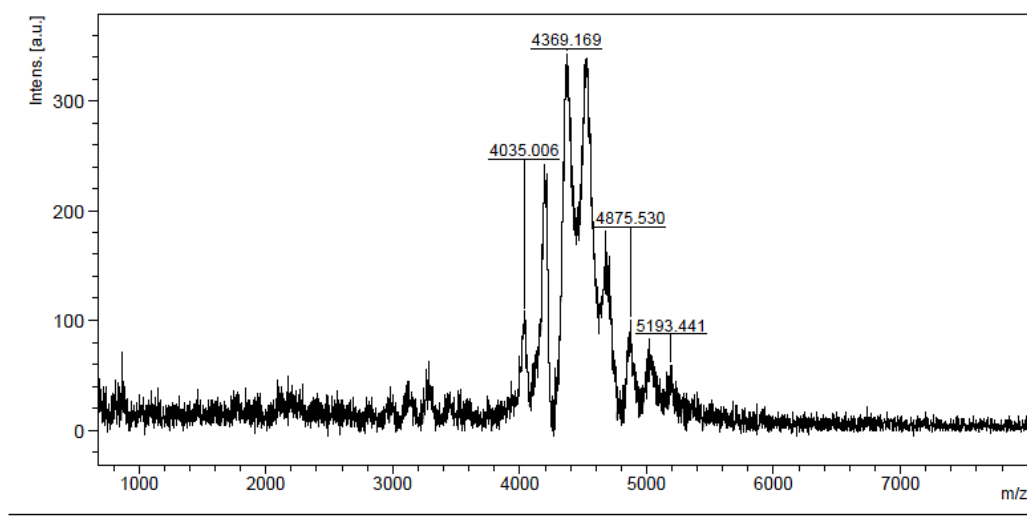


Рисунок 28 – Типичный спектр поглощения конъюгата ASM-45 в УФ и видимой областях



m/z	Rel. Intens.	Area	SN
866.470	22	138	2.5
4035.006	27	166	1.8
4189.730	65	436	4.4
4369.169	100	886	7.1
4515.505	98	364	7.3
4683.090	49	244	3.8
4875.530	26	174	2.1
5193.441	14	43	1.2

Рисунок 29 – Типичный MALDI-TOF масс-спектр конъюгата ASM-46 (раствор в 0,1 М NaOH)

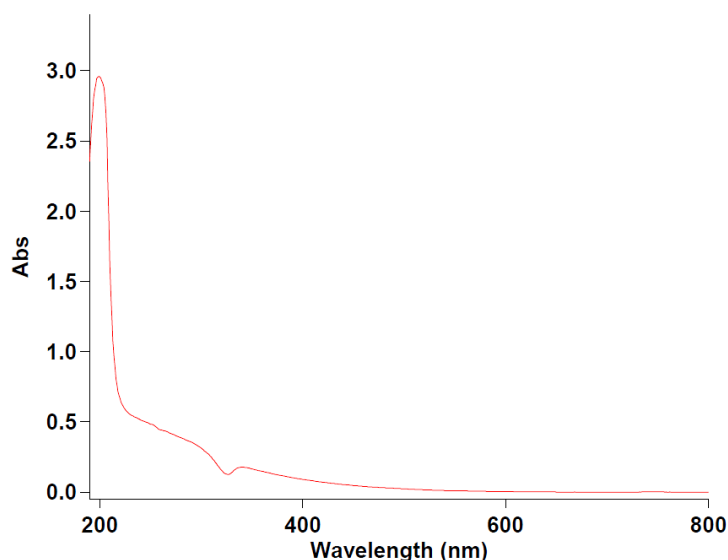
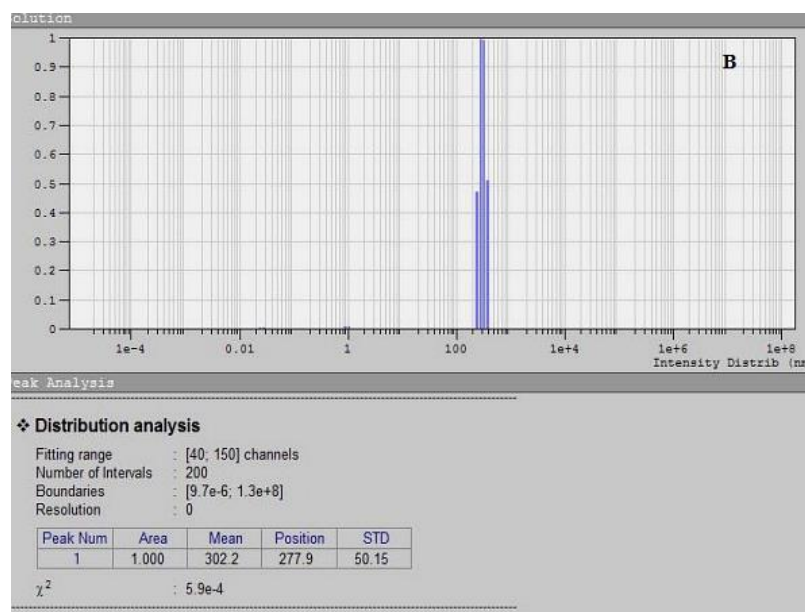


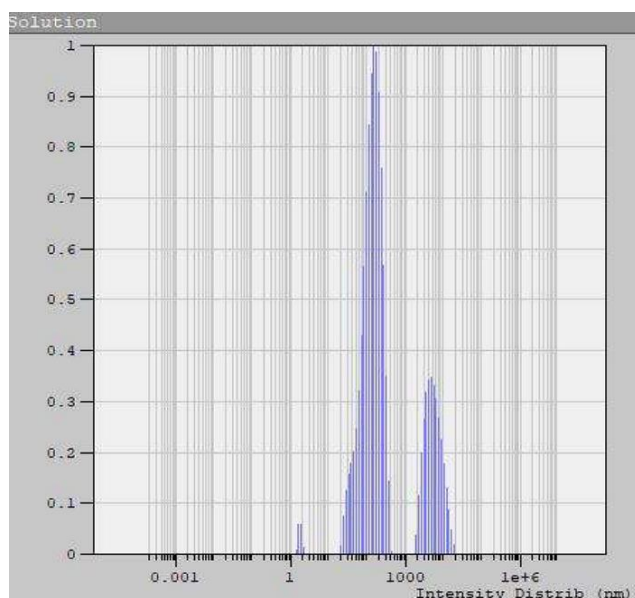
Рисунок 30 – Типичный спектр поглощения конъюгата ASM-46 (раствор в 0,1 М NaOH) в УФ и видимой областях

Далее на основе катионных пептидов АВ-14, АВ-17 и АВ-18 и фуллерена C60 были получены электростатические комплексы K14, K17 и K18. Образование комплекса между данными пептидами и ВРФ в водных растворах было обосновано данными лазерного динамического светорассеяния (рисунки 31, 32, 33, 34).



Z-potential = **-14.03886003** +/- 3.110050993e-002 mV

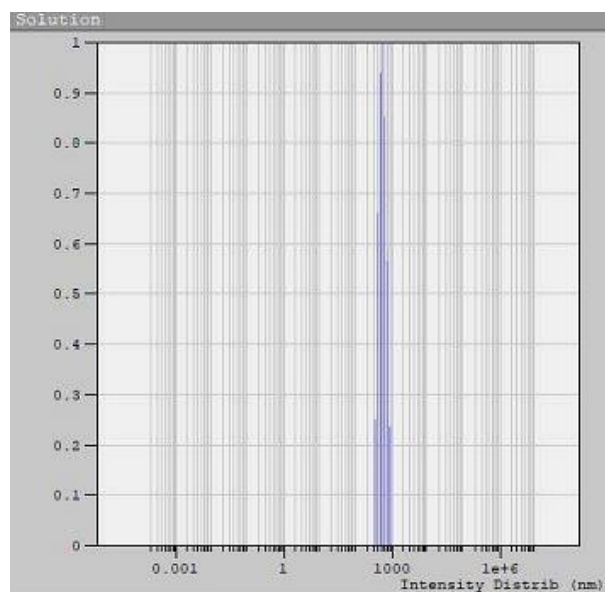
Рисунок 31 – Диаграмма распределения размеров наночастиц водной дисперсии фуллерена C60 в водной среде



Peak Num	Area	Mean	Position	STD
1	0.010	1.727	1.814	0.198
2	0.741	145.3	145.8	76.69
3	0.249	5931.	4727.	3199.

Z-potential = **2.09886003** +-1.90050993e-002 mV

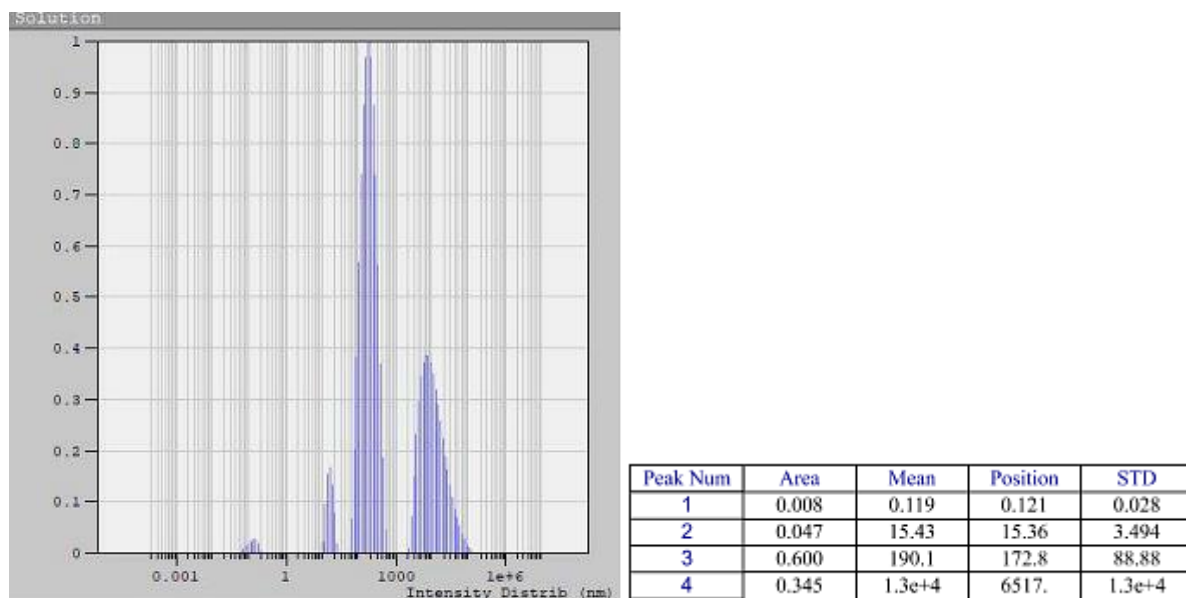
Рисунок 32 – Диаграмма распределения размеров наночастиц водной дисперсии фуллерена C60 с катионным пептидом АВ-14 в водной среде



Peak Num	Area	Mean	Position	STD
1	1.000	535.6	526.3	130.3

Z-potential = **3.04962206** +-3.90049256e-002 mV

Рисунок 33 – Диаграмма распределения размеров наночастиц водной дисперсии фуллерена C60 с катионным пептидом АВ-17 в водной среде



Z-potential = **0.939517736** +-9.02965572e-003 mV

Рисунок 34 – Диаграмма распределения размеров наночастиц водной дисперсии фуллерена C60 с катионным пептидом АВ-18 в водной среде

На рисунке 27 показан размер (радиус) наночастиц фуллерена C60 (около 300 нм) исходного ВРФ и их отрицательный поверхностный заряд (дзета-потенциал) - 14,038. Все катионные пептиды имели позитивный заряд от +8 до +12. При смешивании в водном растворе наночастицы фуллерена C60 и катионные пептиды образовывали электростатические комплексы и, вероятно, имели между собой гидрофобные взаимодействия вследствие того, что фуллерен имеет гидрофобную поверхность, а пептиды содержат гидрофобные аминокислоты (триптофан (W), лейцин (L), изолейцин (I)). Экспериментальное подтверждение образования комплекса выражалось в изменении дзета-потенциала (повышении заряда), а также в возрастании размера наночастиц. Приведенные диаграммы комплексов K14, K17 и K18 (рисунки 28, 29, 30) демонстрировали описанные эффекты: было показано увеличение заряда частиц до 2,1, 3,05 и 0,94 mV, соответственно, и возрастание размера частиц от 302,2 нм до 5931, 535,6 и примерно 13000 нм, соответственно.

3.5 Изучение антибактериальной активности комбинированных соединений

3.5.1 Оценка антибактериальной активности в отношении лабораторного штамма *E. coli* Dh5α

Оценка антибактериальной активности комбинированных соединений на основе катионных пептидов и фуллерена C60 основывалась на подсчете колоний и последующем расчете минимальной бактерицидной концентрации, за которую принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую гибель 99,9 % бактериальных клеток.

Далее представлен анализ бактерицидной активности каждого исследуемого соединения. Так, на рисунке 35 представлены результаты анализа бактерицидной активности конъюгата K46.

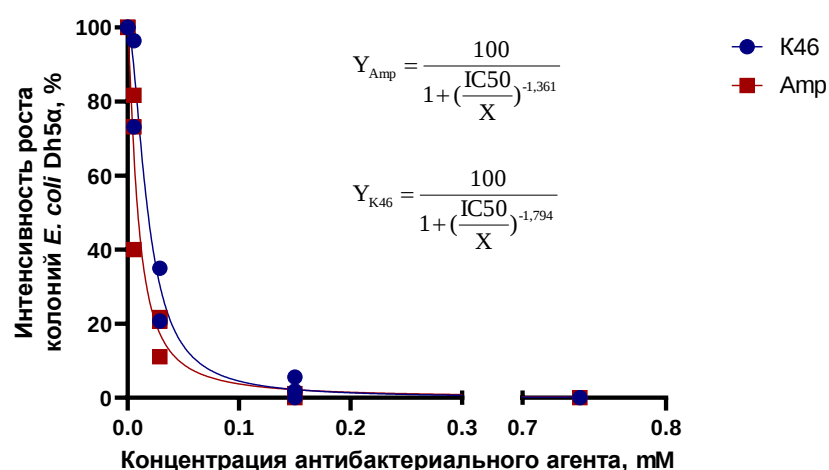


Рисунок 35 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций конъюгата K46 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Показано, что данный конъюгат проявлял бактерицидную активность в отношении штамма *E. coli* Dh5α. Минимальная бактерицидная концентрация составляла 0,2360 mM, то есть уровень проявленной данным конъюгатом активности был сопоставим с активностью положительного контроля, которым являлся ампициллин (МБК составляла 0,2685 mM).

На рисунке 36 показана бактерицидная активность конъюгата K46-2.

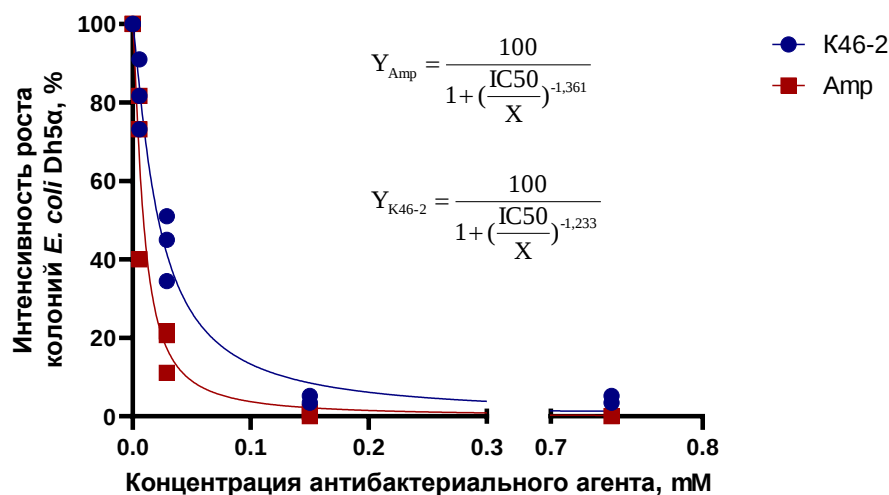


Рисунок 36 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций конъюгата K46-2 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Показано, что данное соединение также обладает антибактериальной активностью в отношении штамма *E. coli* Dh5α. МБК для K46-2 составляла 0,9086 мМ, то есть проявленный конъюгатом уровень активности был несколько ниже такового положительного контроля.

Далее, на рисунке 37 представлена активность конъюгата ASM-38.

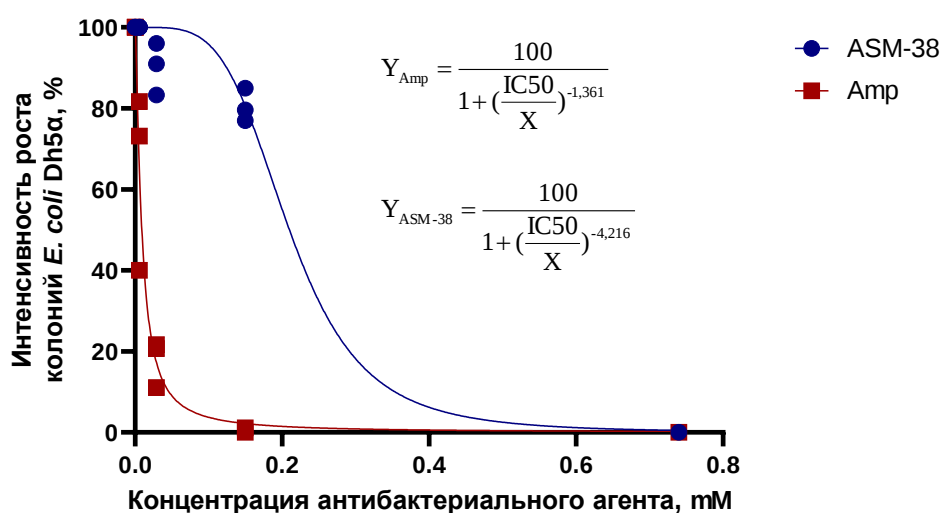


Рисунок 37 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций конъюгата ASM-38 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Показано, что МБК для ASM-38 составляла 0,6246 mM. При данной концентрации наблюдалась 100 % гибель бактериальных клеток. Тем не менее, при более низких концентрациях данный конъюгат терял бактерицидную активность.

На рисунке 38 показана бактерицидная активность конъюгата ASM-40.

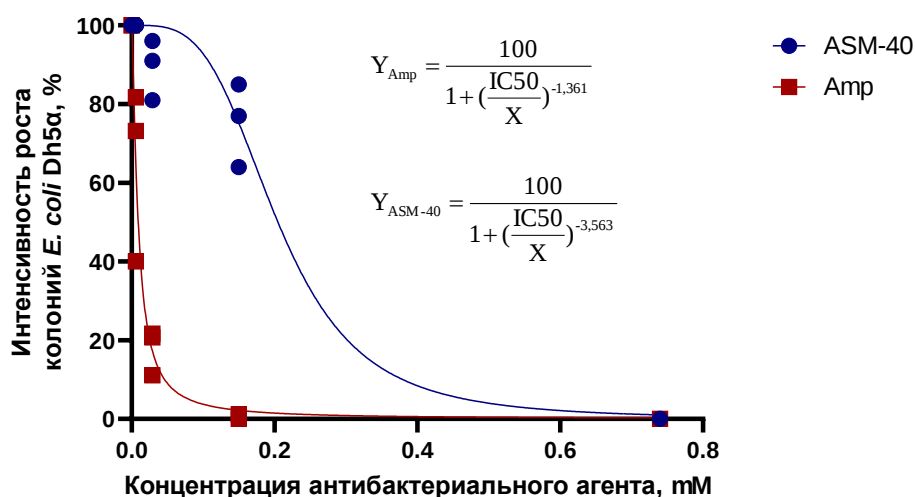


Рисунок 38 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций конъюгата ASM-40 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

МБК для конъюгата ASM-40 составила 0,7438 mM. Следует отметить, что в концентрации 0,1488 mM (всего в 5 раз ниже бактерицидной) конъюгат не показал какой-либо существенной активности в отношении *E. coli* Dh5α, что указывает на узкий рабочий диапазон концентраций.

Далее, была изучена бактерицидная активность конъюгата ASM-45 (рисунки 39, 40).

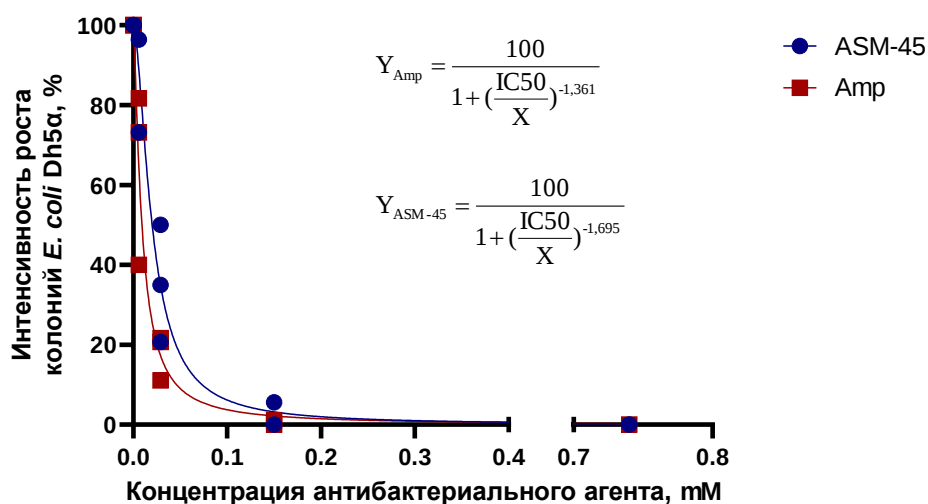


Рисунок 39 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций конъюгата ASM-45 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

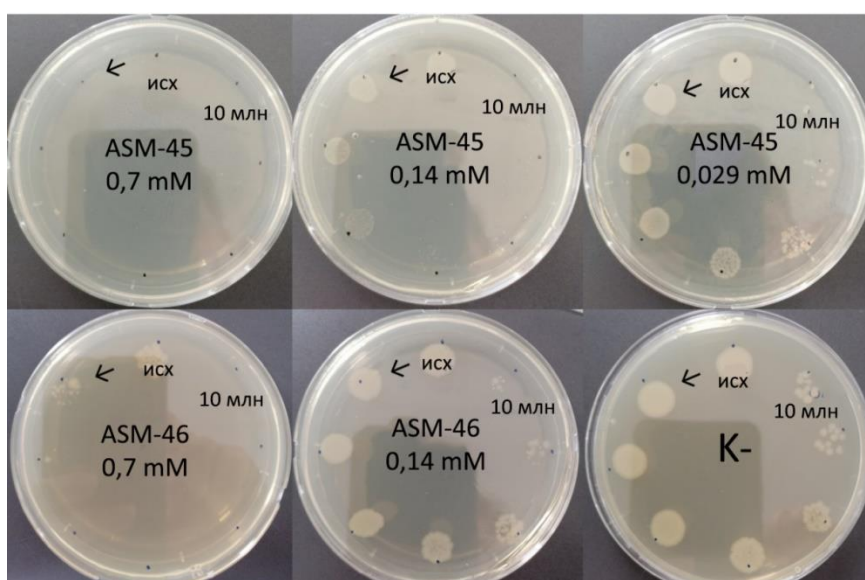


Рисунок 40 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *E. coli* Dh5α методом подсчета колоний. «ASM-45» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии ASM-45 в концентрациях 0,7 мМ, 0,14 мМ и 0,029 мМ; «ASM-46» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии ASM-46 в концентрациях 0,74 мМ и 0,14 мМ; «К-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

На представленном графике видно, что данное соединение демонстрирует очевидную бактерицидную активность в отношении *E. coli* Dh5 α (МБК составила 0,3018 mM). При этом активность ASM-45 была несколько ниже по сравнению с контрольным антибиотиком ампициллином.

Далее, была проведена оценка бактерицидной активности конъюгата ASM-46 (рисунки 40, 41).

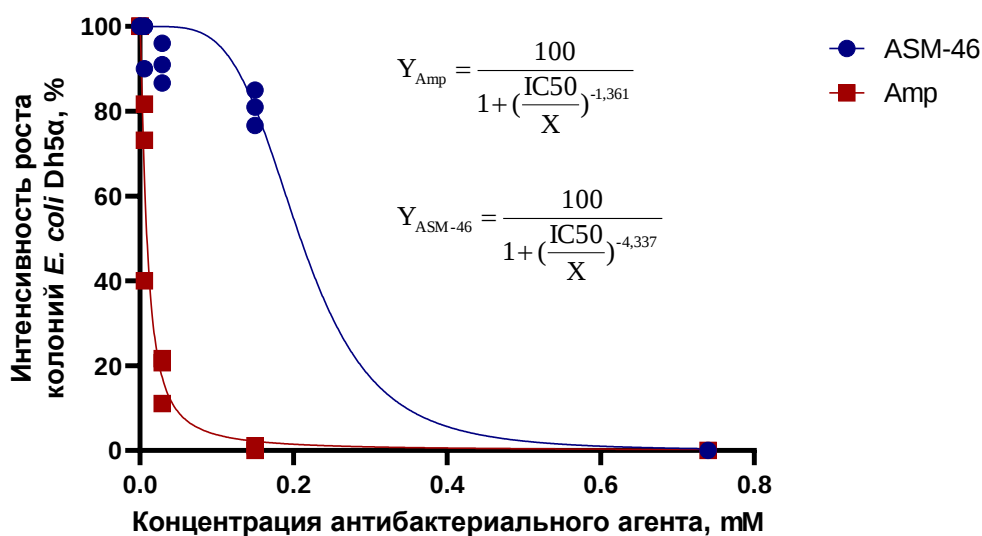


Рисунок 41 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5 α в присутствии разных концентраций конъюгата ASM-46 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Данный конъюгат также продемонстрировал бактерицидную активность в отношении *E. coli* Dh5 α . Показано, что минимальная концентрация, при которой наблюдалась 100 % гибель микробных клеток, для данного соединения составляла 0,6033 mM. Однако, при более низкой концентрации 0,1488 mM конъюгат ASM-46 не проявлял бактерицидной активности, что говорит об узком диапазоне рабочих концентраций.

Рисунки 42 и 43 иллюстрирует бактерицидную активность комплекса K14.

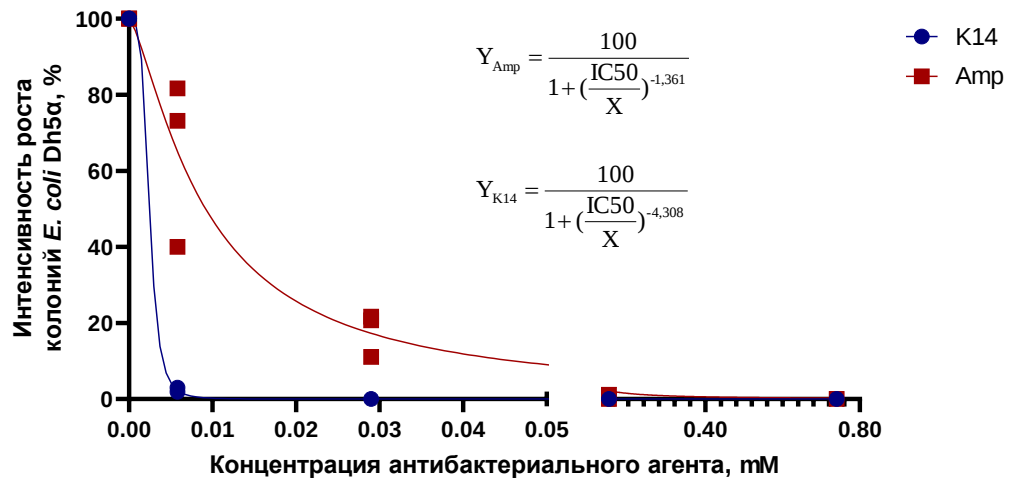


Рисунок 42 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций комплекса K14 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

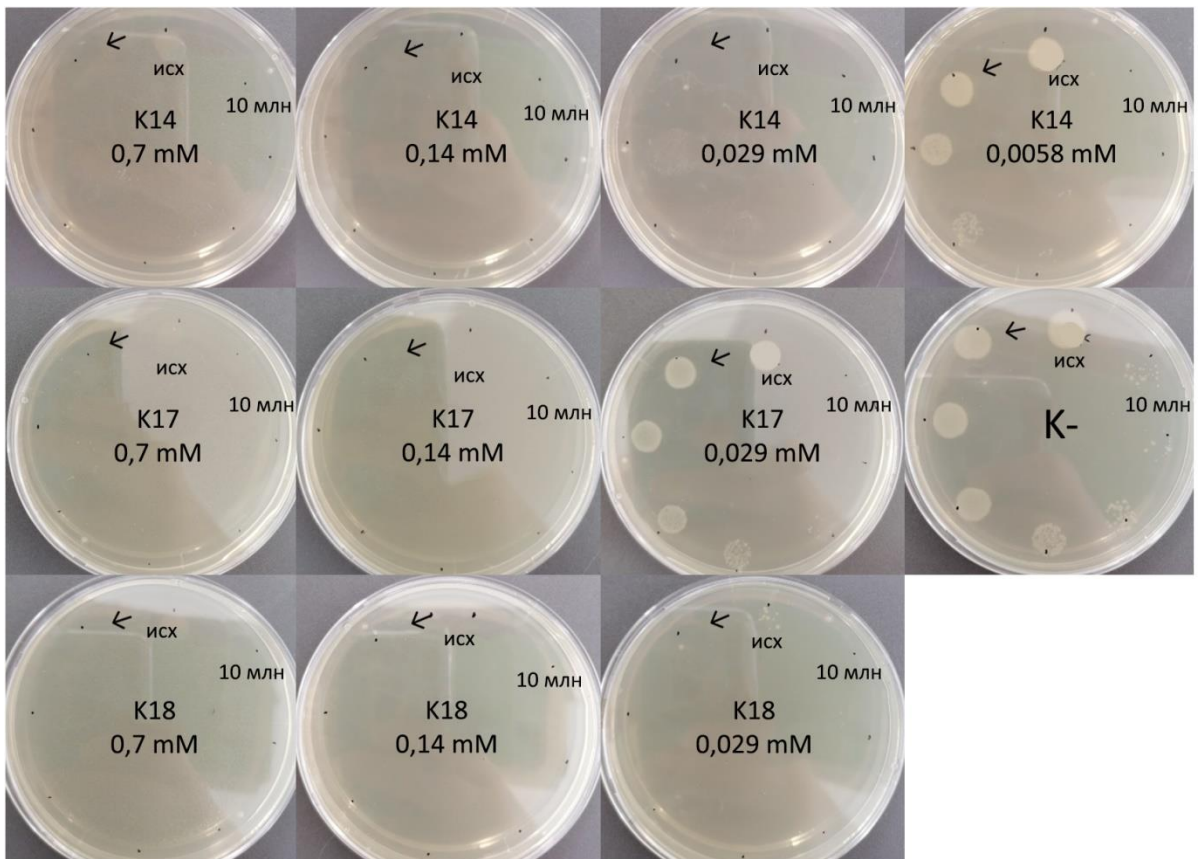


Рисунок 43. Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *E. coli* Dh5α методом подсчета колоний. «K14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; «K17» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K17 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; «K18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K18 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM, 0,029 mM и 0,0058 mM; «K-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:100000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Показано, что комплекс K14 обладал ярко выраженной бактерицидной активностью в отношении штамма *E. coli* Dh5α, уровень которой существенно превышал таковой положительного контроля. МБК данного комплекса составила 0,0070 mM и соответствовала таковой пептида АВ-14, на основе которого

разработан комплекс K14. Это свидетельствовало о том, что данный пептид сохранял свою антибактериальную активность в составе комплекса с фуллереном C60.

Далее провели оценку бактерицидной активности комплекса K17 (рисунок 43, 44).

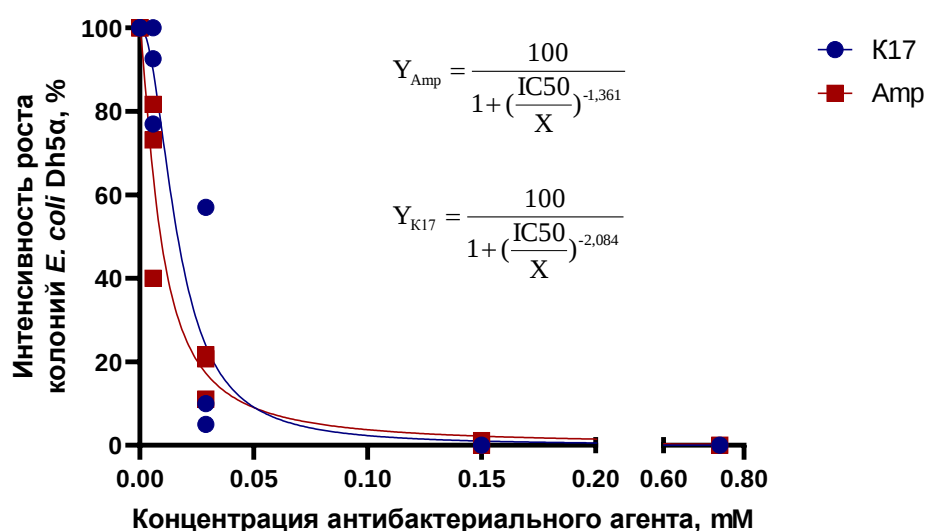


Рисунок 44 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций комплекса K17 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

K17 продемонстрировал более выраженную бактерицидную активность в отношении *E. coli* Dh5α в сравнении с положительным контролем. МБК для K17 составила 0,1508 mM, что соответствовало таковой для пептида АВ-17, входящего в состав данного комплекса.

На рисунках 43, 45 представлена бактерицидная активность комплекса K18.

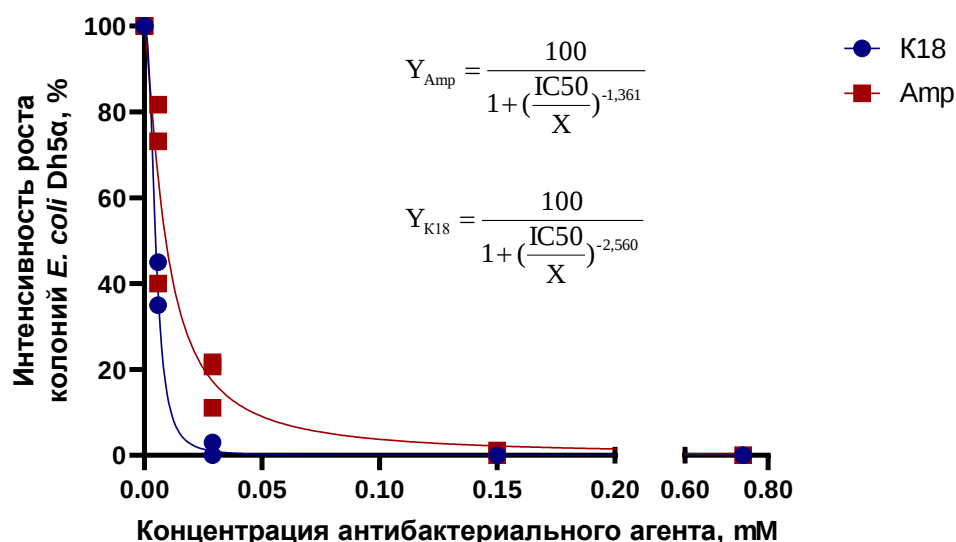


Рисунок 45 – Активность роста культуры *E. coli* Dh5α в присутствии разных концентраций комплекса K18 и ампициллина (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

В отношении *E. coli* Dh5α K18 продемонстрировал ярко выраженную бактерицидную активность. Минимальная бактерицидная концентрация составляла 0,0290 mM, что превышает таковую для положительного контроля в 10 раз. Данный комплекс проявил бактерицидную активность на том же уровне, что и пептид АВ-18, входящий в состав K18, что также указывает на сохранение антибактериальной активности пептида в составе комплекса.

Таким образом, анализ бактерицидной активности полученных конъюгатов и комплексов в отношении *E. coli* Dh5α показал наличие таковой у девяти исследуемых соединений (таблица 19, рисунок 46).

Таблица 19 – Конъюгаты и комплексы, продемонстрировавшие антибактериальную активность в отношении *E. coli* Dh5 α

№	Шифр	МБК, mM
1	K46	0,2360
2	K46-2	0,9086
3	ASM-38	0,6246
4	ASM-40	0,7438
5	ASM-45	0,3018
6	ASM-46	0,6033
7	K14	0,0070
8	K17	0,1508
9	K18	0,0290

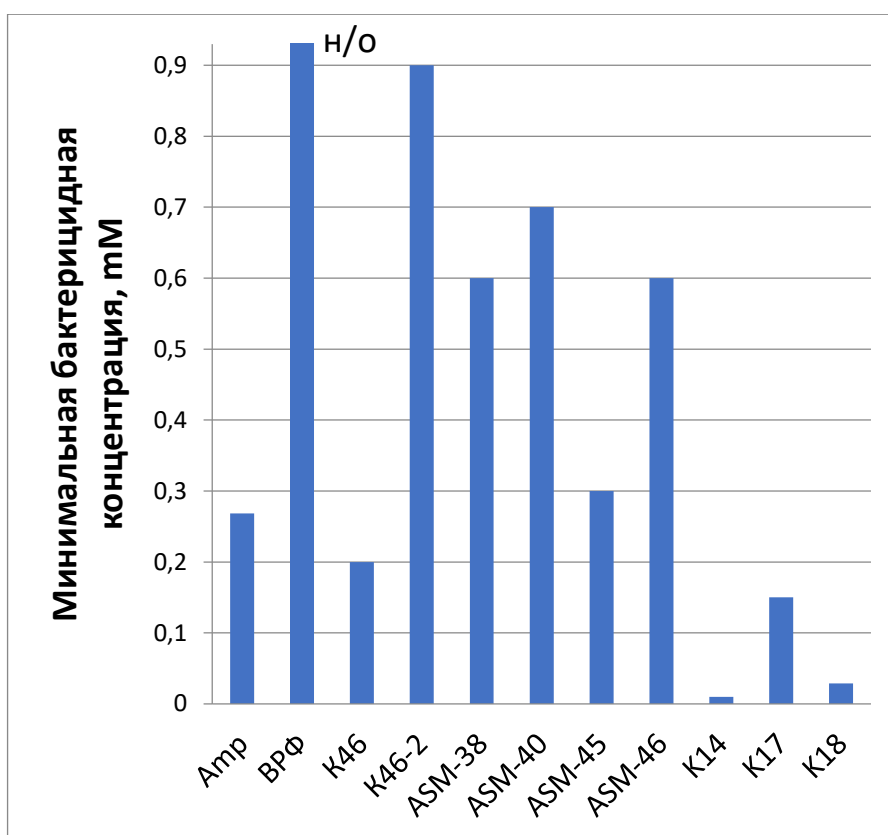


Рисунок 46 – Интенсивность роста колоний *E. coli* Dh5 α в присутствии конъюгатов и комплексов на основе катионных пептидов и фуллерена C60 с выявленной антибактериальной активностью. «Amp» – антибиотик ампициллин; «ВРФ» – водный раствор фуллерена C60; «н/о» – не определяется

На графике видно, что наибольшей бактерицидной активностью обладали соединения KK46, ASM-45, K14, K17 и K18. Среди конъюгатов на основе пептида KK-46 (K46, K46-2, ASM-36 и ASM-45) наибольшей активностью обладали K46 (МБК 0,2360 mM) и ASM-45 (МБК 0,3018 mM), однако ASM-45 проявлял более высокую растворимость в водной среде, чем K46, вследствие чего был отобран для исследования цитотоксичности. Среди конъюгатов на основе пептида ST-10 (ASM-40, ASM-46) наибольшей бактерицидной активностью обладал ASM-46 (МБК 0,6033 mM), который также был отобран для дальнейшего изучения.

Для сравнительного анализа на графике приведены результаты оценки антибактериальной активности водного раствора фуллерена C60, использованного в качестве контрольного образца. Было показано отсутствие ингибирующего эффекта ВРФ на рост бактерий штамма *E. coli* Dh5α в исследуемом диапазоне концентраций (0,7250-0,0058 mM).

3.5.2 Оценка антибактериальной активности в отношении штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки

Наиболее перспективные комбинированные соединения, показавшие выраженную антибактериальную активность в рамках первичного скрининга, а именно K14, K17 и K18, были отобраны для последующего изучения на примере микроорганизмов других штаммов и видов с целью определения спектра действия исследуемых препаратов. Активность комплексов оценивали в отношении нескольких штаммов кишечной палочки, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью, двух штаммов синегнойной палочки (в том числе штамма с МЛУ), в отношении *S. aureus*, *S. agalactiae*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Было выявлено, что отобранные комплексы обладают бактерицидной активностью в отношении данных грам-отрицательных и грам-положительных бактерий, среди которых присутствуют клинически важные условно-патогенные штаммы. В таблице 20 приведены значения МБК отобранных комплексов в отношении видов бактерий с разным строением клеточной стенки.

Таблица 20 – Антибактериальная активность комплексов катионных пептидов и фуллерена C₆₀, определенная методом диффузии в агар, в отношении клинических значимых патогенных микроорганизмов. МЛЮ - множественная лекарственная устойчивость

Вид микроорганизма	Штамм	Минимальная бактерицидная концентрация, mM			
		Ампициллин	K14	K17	K18
<i>E. coli</i>	4sR	0,7	-	0,14	0,14
	4sI	0,7	-	0,14	0,14
	4s	-	-	0,14	0,14
	МЛЮ	-	0,029	-	0,0569
Вид микроорганизма	Штамм	Канамицин	K14	K18	
<i>P. aeruginosa</i>	РАО	0,7	-	0,14	
	МЛЮ	-	0,7	0,14	
Вид микроорганизма		K14		K18	
<i>S. aureus</i>		-		0,14	
Вид микроорганизма		K14		K18	
<i>S. agalactiae</i>		0,2154		0,14	
Вид микроорганизма		Канамицин	K14	K18	
<i>K. pneumoniae</i>		0,7	0,029	0,14	
Вид микроорганизма		K14			
<i>A. baumannii</i>		0,029			

В ходе изучения бактерицидной активности K17 и K18 в отношении патогенных штаммов кишечной палочки была продемонстрирована способность комплексов подавлять рост бактерий *E. coli* 4S, 4SI и 4SR. МБК для K17 и K18 составила 0,14 mM в отношении всех штаммов кишечной палочки, то есть в 5 раз ниже таковой для положительного контроля (0,7 mM).

Рисунок 47 иллюстрирует бактерицидную активность комплекса K14.

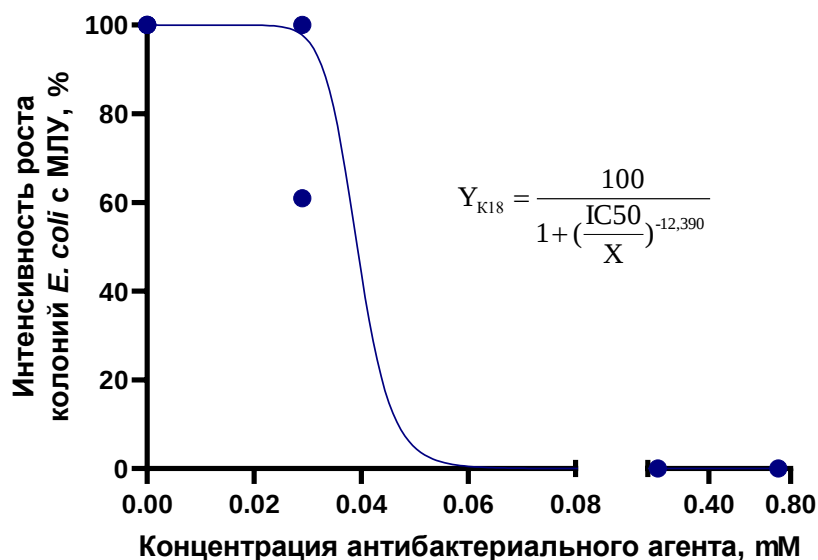


Рисунок 47 – Активность роста полирезистентного штамма *E. coli* в присутствии разных концентраций комплекса K18 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Комплексы K14 и K18 также обладали бактерицидной активностью (0,029 mM и 0,0569 mM, соответственно) в отношении штамма *E. coli* с МЛУ. Бактерии данного штамма были частично устойчивы к имипенему и резистентны к цефотаксиму, левофлоксацину, гентамицину, смеси триметоприм/сульфаметокс, смеси амоксициллин/клавуланат, цефтазидиму, меропенему, амикацину, ципрофлоксацину, вследствие чего положительный контроль для исследования не был подобран. МБК исследуемых соединений K17 и K18 в отношении вышеупомянутых штаммов кишечной палочки были сопоставимы с МБК пептидов АВ-17 и АВ-18, входящих в состав комплексов (раздел 3.2.2).

Далее, была проведена оценка антибактериальной активности K14 и K18 в отношении штаммов другого клинически значимого патогена - *P. aeruginosa*. Показано, что комплекс K18 обладал бактерицидной активностью в отношении штамма *P. aeruginosa* PAO, сопоставимой с таковой пептида АВ-18, входящего в его состав (МБК составила 0,14 мМ). Активность K18 превышала таковую положительного контроля, канамицина, в 5 раз (0,7 мМ). Комплекс K14, напротив, не обладал способностью подавлять рост бактерий *P. aeruginosa* PAO, хотя входящий в состав K14 пептид АВ-14 прежде обладал таковой (раздел 3.2.2).

Комплексы K14 и K18 показали бактерицидную активность в отношении штамма *P. aeruginosa* с МЛУ, частично устойчивого к цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, имипенему и полностью устойчивого к пиперациллину, тобрамицину, амикацину, ципрофлоксацину, тикарциллину и меропенему. МБК для комплексов составили 0,7 и 0,14 мМ, соответственно, что соответствовало МБК пептидов АВ-14 и АВ-18 в отношении *P. aeruginosa* с МЛУ (раздел 3.2.2).

Была выявлена бактерицидная активность K18 в отношении *S. aureus*, сопоставимая с таковой пептида АВ-18 (МБК составили 0,14 мМ). При этом пептид АВ-14 терял свою активность против данного вида бактерий в составе комплекса с фуллереном C60 (рисунок 48).

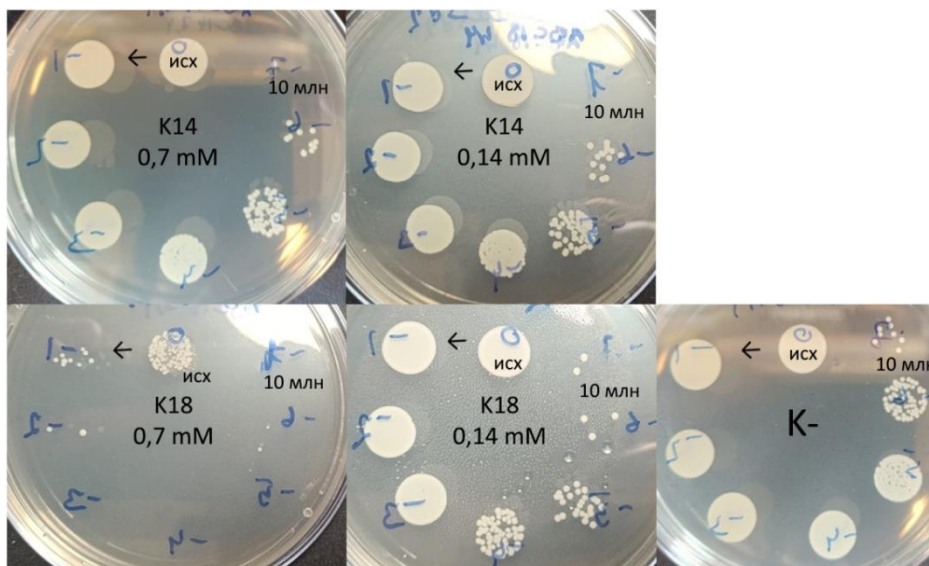


Рисунок 48 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *S. aureus* методом подсчета колоний. «K14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K14 в концентрациях 0,7 mM и 0,14 mM; «K18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K18 в концентрациях 0,74 mM и 0,14 mM; «K-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:100000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл

Далее была проведена оценка бактерицидной активности K14 и K18 в отношении *S. agalactiae*. На рисунке 49 представлена активность комплекса K14 против полирезистентного штамма данного вида бактерий.

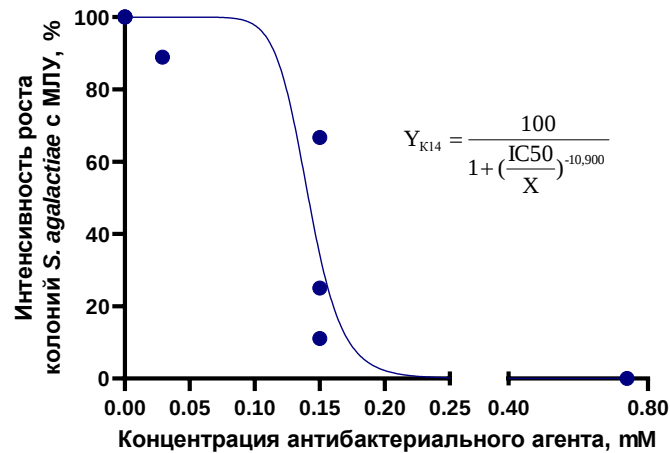


Рисунок 49 – Активность роста полирезистентного штамма *S. agalactiae* в присутствии разных концентраций комплекса K14 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

МБК составили 0,2154 mM для K14 и 0,14 mM для K18 (рисунок 50).

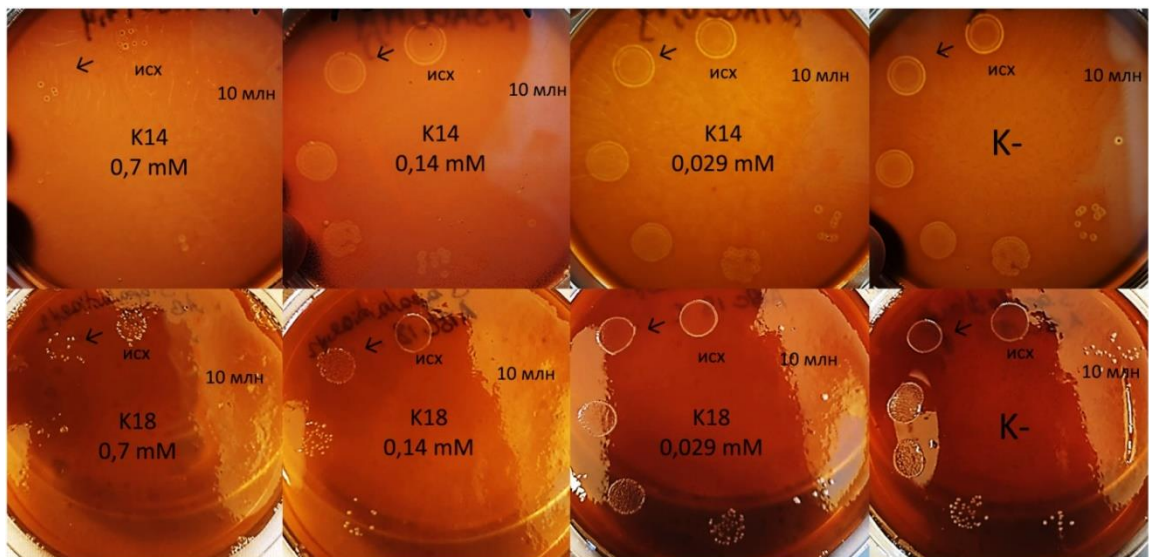


Рисунок 50 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *S. agalactiae* методом подсчета колоний. «K14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «K18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K18 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «K-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл

На рисунке 51 представлены данные относительно бактерицидной активности комплекса K18 против *K. pneumoniae*.

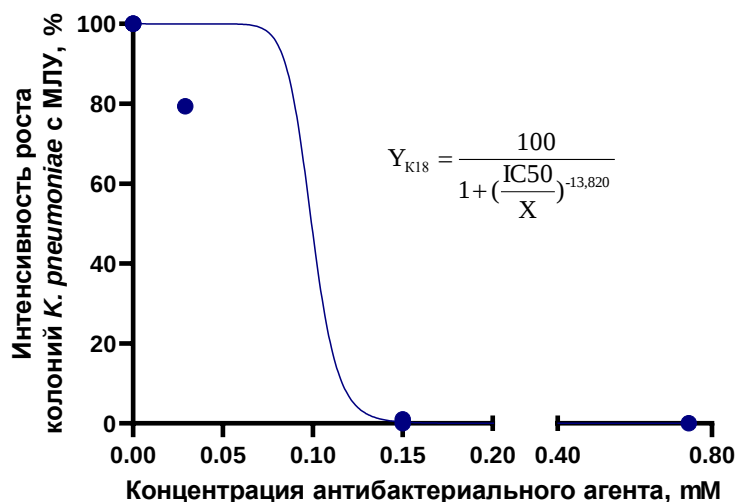


Рисунок 51 – Активность роста полирезистентного штамма *K. pneumoniae* в присутствии разных концентраций комплекса K18 (n = 3). Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Комплексы K14 и K18 обладали антибактериальной активностью против *K. pneumoniae* (МБК составили 0,029 и 0,14 mM, соответственно), превышающей активность антибиотика канамицина, используемого в качестве положительного контроля, в 25 и в 5 раз, соответственно (МБК составила 0,7 mM) (рисунок 52).

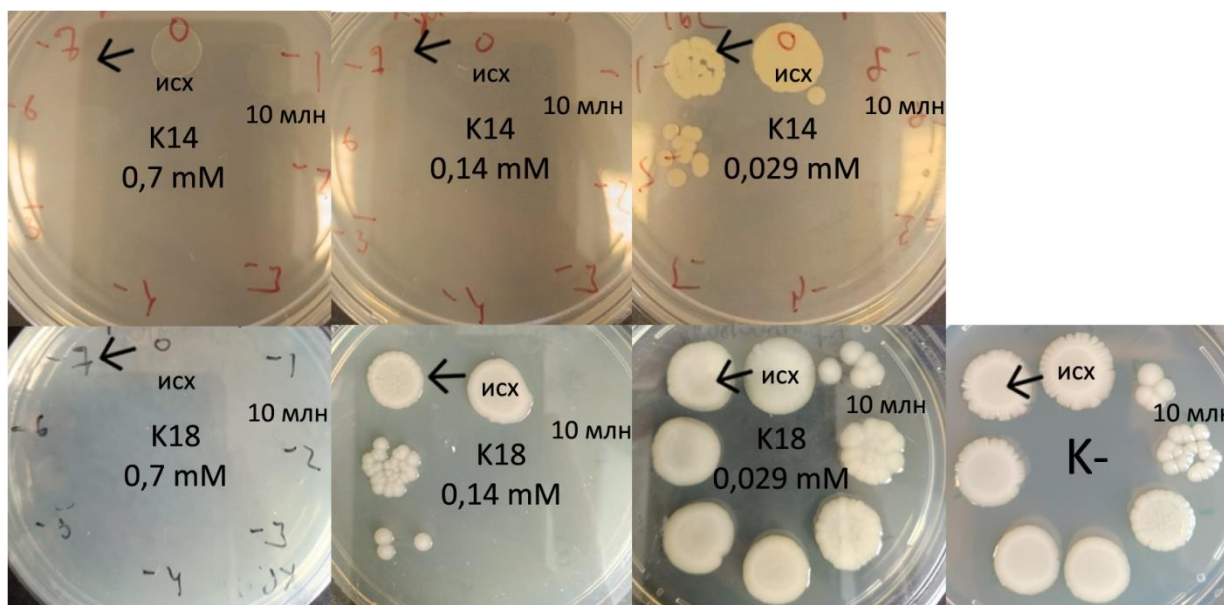


Рисунок 52 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *K. pneumoniae* с МЛУ методом подсчета колоний. «K14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «K18» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K18 в концентрациях 0,74 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «K-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:10000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

При этом МБК для K14 и K18 соответствовали МБК для АВ-14 и АВ-18, входящих в состав указанных комплексов, в отношении данного бактериального штамма.

Комплекс K14 также обладал бактерицидной активностью в отношении *A. baumannii* при концентрации 0,029 mM (рисунок 53).

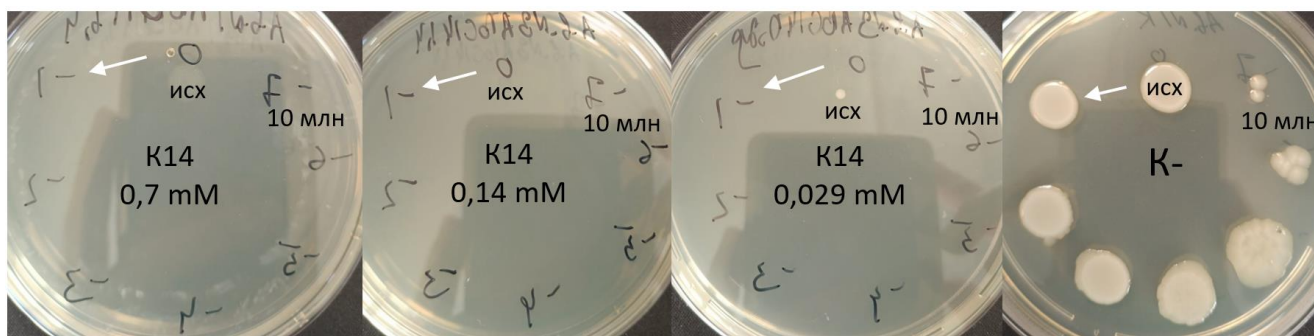


Рисунок 53 – Фотографии чашек Петри после проведения исследований бактерицидной активности в отношении штамма *A. baumannii* с МЛУ методом подсчета колоний. «K14» – инкубация бактериальной суспензии в присутствии K14 в концентрациях 0,7 mM, 0,14 mM и 0,029 mM; «K-» – инкубация бактериальной суспензии без антибактериального агента (отрицательный контроль). Примечание: разведения бактериальной культуры указаны на каждой чашке Петри в порядке уменьшения концентрации бактериальных клеток по направлению символа «↙» (против часовой стрелки), где «исх» - исходное разведение бактериальной культуры, затем ряд разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, «10 млн» - разведение бактериальной культуры 1:100000000. Общее микробное число для исходной бактериальной суспензии *E. coli* Dh5α составило $5,4 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о том, что синтетические антимикробные пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18 преимущественно сохраняли антибактериальную активность в составе комплексов с фуллереном C₆₀. Комплексы демонстрировали выраженную бактерицидную активность (МБК преимущественно составляла 0,14 mM), превышающую таковую контрольного антибиотика (МБК ампициллина и канамицина составляла 0,7 mM) (рисунок 54).

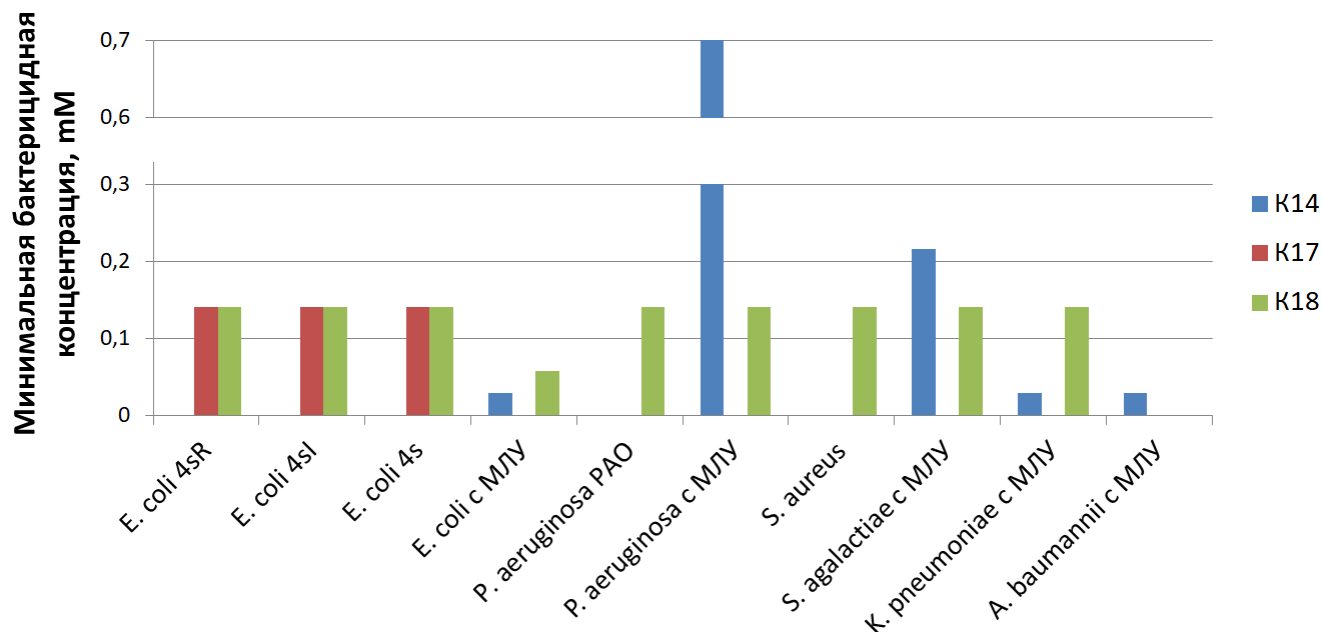


Рисунок 54 – Антибактериальная активность комплексов K14, K17, K18 в отношении клинических значимых видов бактерий. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Характерной особенностью комплексов K14 и K18 являлось то, что они были способны подавлять рост как грам-положительных, так и грам-отрицательных микроорганизмов и, таким образом, являются перспективной основой для создания антибактериальных средств.

3.6 Изучение цитотоксичности комбинированных соединений

Исследуемые соединения ASM-46 и ASM-45 были образованы посредством конъюгирования, вследствие чего представляют собой молекулы с новыми свойствами и нуждались в проведении дополнительных исследований цитотоксичности.

Катионные пептиды и фуллерен C60 в составе комплексов K14, K17 и K18 были связаны за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий без дополнительных химических модификаций, что не требовало дополнительного изучения цитотоксической активности этих комплексов. Цитотоксическая активность данных комплексов была сопоставима с таковой пептидов АВ-14, АВ-17 и АВ-18, входящих в их состав.

Для оценки цитотоксичности конъюгатов и комплексов на основе фуллерена C60 и катионных пептидов определяли выживаемость клеток при различных дозах исследуемых соединений. Анализ цитотоксической активности ASM-45 и ASM-46 (конъюгаты фуллерена C60 с пептидами KK-46 и ST-10, соответственно) был проведен на линиях клеток A549, HeLa и mells (рисунок 55).

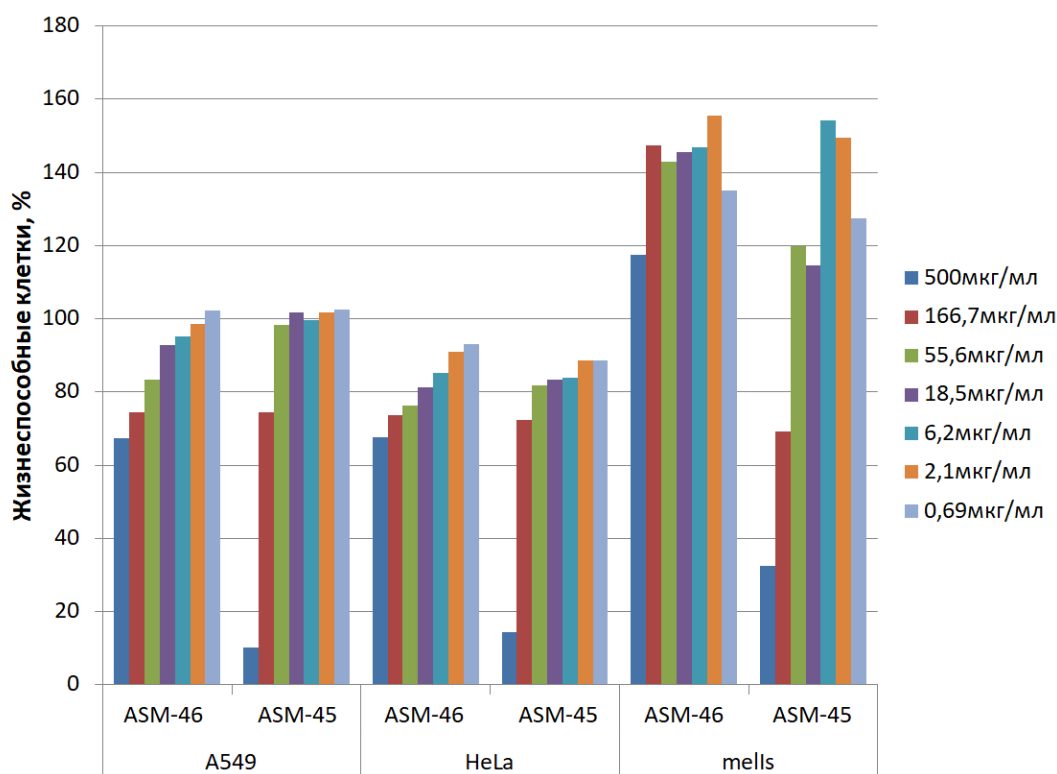


Рисунок 55 – Цитотоксическая активность конъюгатов ASM-45 и ASM-46 в отношении культур клеток A549, HeLa и mells

Конъюгат ASM-45 проявлял выраженную цитотоксическую активность в концентрации 500 мкг/мл. Наиболее токсичным данное соединение оказалось для клеток линии A549. Что касается конъюгата ASM-46, то, даже в присутствии его максимальной концентрации (500 мкг/мл), выживало более 65 % клеток. Для линии клеток mells наблюдалось отсутствие цитотоксического эффекта в присутствии конъюгата ASM-46. Для исследуемых соединений был рассчитан индекс цитотоксичности (таблица 21).

Таблица 21 – Цитотоксическая активность конъюгатов ASM-46 и ASM-45 и комплексов K14, K17 и K18 в отношении клеточных культур Wi-38, A549, HeLa и mells

Шифр	IC ₅₀ , мкг/мл				
	Клеточная линия	Wi-38	A549	HeLa	mells
ASM-46		-	1009,5	1210,46	1798,5
ASM-45		-	291,1	280,30	341,2
K14		252,1	49	170	51
K17		301	-	35	-
K18		317	-	39,2	-

Из представленных данных видно, что конъюгат ASM-45 являлся более токсичным по сравнению с ASM-46. Согласно классификации цитотоксичности по IC₅₀ [118], соединения с IC₅₀ 200-2000 мкг/мл считаются малотоксичными, что является основанием для продолжения исследований их биологической активности.

Полученные данные свидетельствуют о малой токсичности конъюгатов и комплексов в пределах используемых концентраций в отношении линий клеточных культур Wi-38, A549, HeLa и mells, что позволяет продолжить изучение их биологической активности *in vivo*.

3.7 Оценка противовоспалительной активности комбинированных соединений на модели состояния эндотоксического шока *in vivo*

3.7.1 Оценка общей и посуточной летальности

Для оценки противовоспалительной активности комплексов была разработана и воспроизведена модель LPS-индуцированного шока *in vivo*. Анализ общей летальности проводили каждые 24 часа с момента введения LPS. На основании полученных показателей рассчитывали процент выживаемости по каждой группе (рисунок 56).

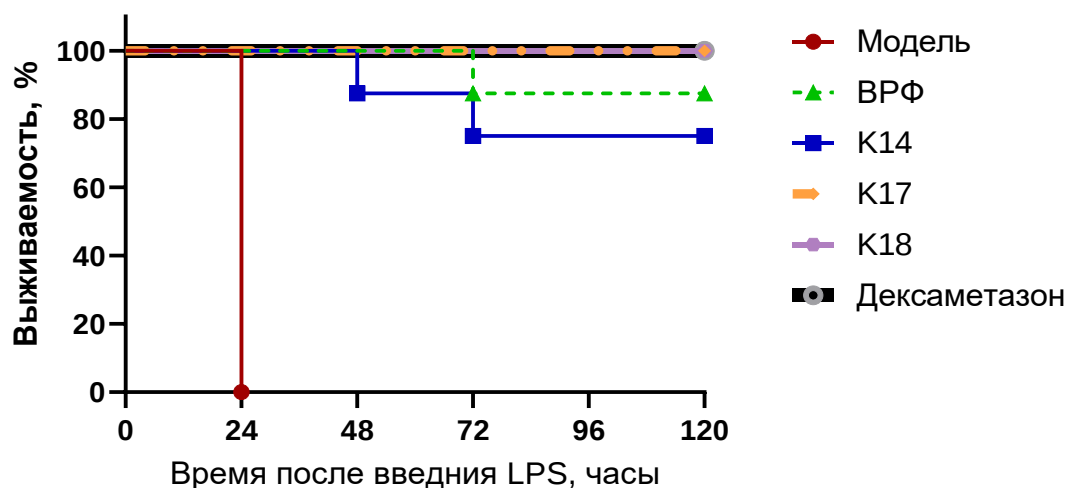


Рисунок 56 – Выживаемость мышей, получавших и не получавших терапию исследуемыми соединениями. Падеж животных регистрировали каждые 24 часа в течение 120 часов при моделировании состояния LPS-индуцированного шока (n = 8). «Модель» - животные получали инъекцию LPS без дополнительной терапии; «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию комплексом K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию комплексом K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию комплексом K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - животные не подвергались моделированию состояния эндотоксического шока и введению препаратов

Показано, что введение LPS в дозе 80 мкг/мышь приводило к гибели животных уже через 24 часа после инъекции. Так, в течение первых суток после введения эндотоксина гибель животных группы «Модель» составила 100 %. Профилактическое введение исследуемых препаратов приводило к значительному повышению выживаемости. В группе животных, получавших ВРФ и K14, процент выживаемости составлял 87,5 % и 75 %, соответственно. Выживаемость же в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» (положительный контроль) составила 100 %.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что фуллерен C60 и комплексы на его основе, вероятно, способны оказывать противовоспалительное действие при развитии системной воспалительной реакции. Различия в

выживаемости между группами, получавшими терапию, могли носить как специфический, так и неспецифический характер и нуждались в проведении дальнейшего исследования. Для этого далее проводился анализ уровня экспрессии генов факторов, участвующих в развитии воспалительного ответа, в тканях легких, почек и печени как органов, наиболее подверженных повреждению при развитии состояния эндотоксического шока.

3.7.2 Оценка динамики изменения веса мышей при моделировании состояния эндотоксического шока

Изменение веса лабораторных животных при моделировании состояния эндотоксического шока регистрировали каждые 24 часа с момента введения LPS. У животных, получивших инъекцию эндотоксина, наблюдалась резкая потеря веса (1-2 грамма на мышь) в течение первых двух суток после введения животным эндотоксина. Восстановление веса происходило в течение следующих трех дней минимум на 21,1 % от исходной потери веса.

При моделировании состояния нелетального эндотоксического шока подбирали дозу LPS, которая не вызывала гибель животных, но вызывала клинические признаки системной воспалительной реакции, характерные для эндотоксического шока. Для этого был проведен ряд экспериментов по подбору оптимальной дозы LPS, не вызывающей гибель мышей самок BALB/c весом 18-20 г. По результатам экспериментов было выявлено, что оптимальной является доза 300 мкг/мышь.

На рисунке 57 показано изменение веса мышей относительно исходного уровня в течение 72 часов после введения LPS при моделировании состояния нелетального эндотоксического шока. Подобранная доза эндотоксина не вызывала гибель животных. В рамках этого эксперимента исследуемые соединения вводили через 30 минут после введения LPS.

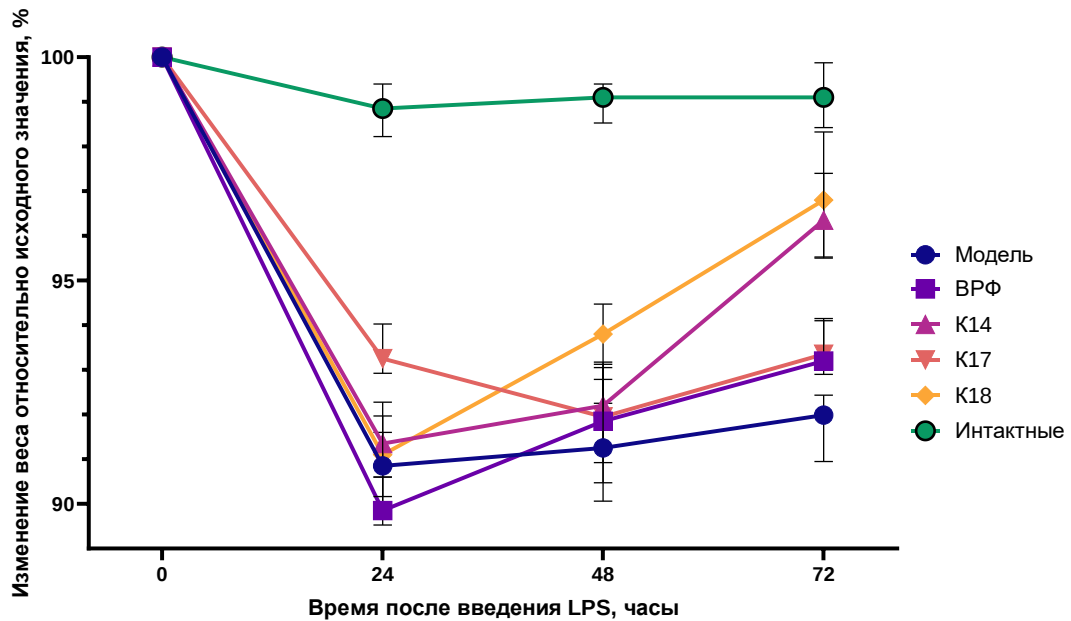


Рисунок 57 – Изменение веса мышей при моделировании состояния нелетального эндотоксического шока (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). «Модель» - животные получали инъекцию LPS без дополнительной терапии; «БРФ» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием БРФ через 30 минут; «K14» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса K14 через 30 минут; «K17» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса K17 через 30 минут; «K18» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса K18 через 30 минут; «Интakтные» - животные не подвергались введению препаратов

На рисунке показано, что животные модельной группы в первые 24 часа после введения эндотоксина теряли вес на 9,1% от исходного. Наименьшую потерю веса наблюдали в группе мышей, получавших терапию комплексом K17 – в первые сутки после инъекции LPS мыши группы «K17» теряли вес на 25 % меньше, чем животные в группе «Модель». Для наглядности изменение веса животных через 72 часа после введения LPS показано на рисунке 58.

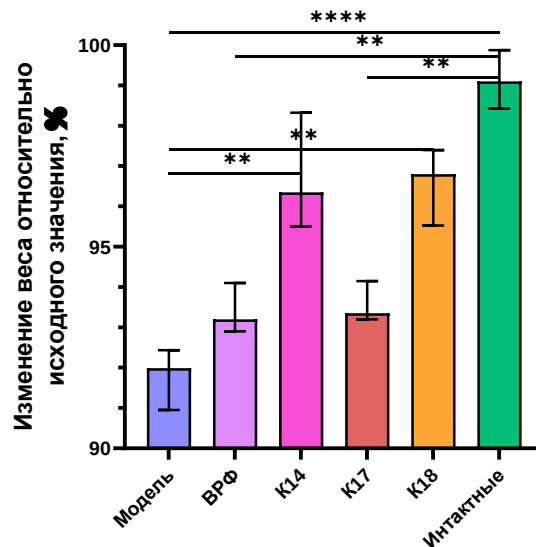


Рисунок 58 – Вес мышей через 72 часа после введения LPS при моделировании нелетального эндотоксического шока (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$. «Модель» - животные получали инъекцию LPS без дополнительной терапии; «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием ВРФ через 30 минут; «К14» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса К14 через 30 минут; «К17» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса К17 через 30 минут; «К18» - животные получали инъекцию LPS и дополнительную терапию с использованием комплекса К18 через 30 минут; «Интактные» - животные не подвергались введению препаратов

Выявлено, что вес животных групп «Модель», «ВРФ» и «К17» через 3 дня после инъекции LPS был ниже исходного (группа «Интактные») на 8 %, 6,8 % и 6,7 %, соответственно. Процент изменения веса животных групп «К14» и «К18» через 72 часа после введения LPS уже достоверно не отличался от такового животных интактной группы и составил 96,4 % и 96,8 % от исходного веса. При этом было выявлено статистически значимое различие между мышами группы «Модель» и животными, получавшими терапию К14 и К18: разница между группами составила 4,5 % от исходного веса животных.

По результатам исследования было показано, что комплексы К14 и К18 способствовали восстановлению веса животных с индуцированным состоянием нелетального эндотоксического шока. Это может быть связано с общим

улучшением состояния здоровья мышей вследствие возможного противовоспалительного действия исследуемых препаратов, позволивших животным, получившим терапию, восстановить режим питания раньше животных группы «Модель».

При моделировании состояния летального эндотоксического шока изменение веса мышей относительно исходного уровня определяли в течение 120 часов после введения LPS (рисунок 59).

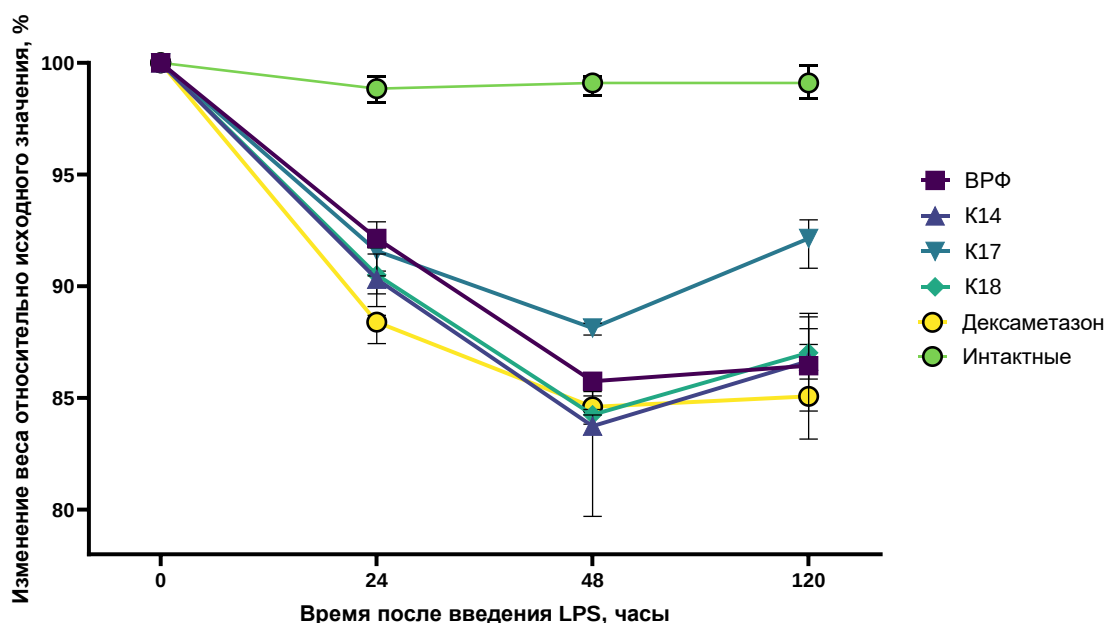


Рисунок 59 – Изменение веса мышей при моделировании состояния летального эндотоксического шока (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - животные не подвергались введению препаратов

Подобранная доза LPS (80 мкг/мышь) вызывала гибель животных в течение первых суток после введения. Динамика изменения веса мышей группы «Модель» не представлена на графике ввиду гибели животных. В рамках этого эксперимента исследуемые соединения вводили до введения LPS за 24 часа и за 1

час. У животных всех экспериментальных групп, получавших инъекцию LPS, была выявлена потеря более 15 % от общей массы тела (у отдельных животных более 20 %). Через 120 часов после начала эксперимента наблюдали частичное восстановление веса мышей всех групп, особенно заметное у животных, получавших K17 в дозе 20 мкг фуллерена C60 и 70 мкг АВ-17 на мышь за 24 часа и за 1 час до введения 80 мкг LPS (на 4,1 % от исходной массы тела). В других группах восстановление веса мышей составило: 0,7 % («ВРФ»), 3 % («K14»), 2,7 % («K18») и 0,4 % («Дексаметазон»).

По совокупности полученных данных можно сделать вывод, что профилактическая терапия исследуемыми препаратами способна в разной степени влиять на потерю и восстановление веса животных. В частности, на модели нелетального эндотоксического шока через 72 часа после введения LPS было показано, что терапия комплексами K14 и K18 ускоряет восстановление веса животных в сравнении с группой «Модель», вероятно, за счет подавления системного воспаления и возобновления полноценного питания.

3.7.3 Оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе

Влияние комплексов катионных пептидов и фуллерена C60 на воспалительный процесс оценивали на экспериментальной модели состояния летального эндотоксического шока. Анализ проводили путем количественного определения мРНК генов *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Ifng*, *Il10*, *Il1rn*, *Adora2a* и *Il4*, кодирующих факторы, участвующие в развитии воспалительного ответа на введение эндотоксина. Материалом для анализа служили легкие, почки и печень мышей, поскольку указанные органы получают наиболее тяжелые повреждения при развитии системной воспалительной реакции на LPS. Повреждения, полученные данными органами при развитии септического шока, наиболее часто связывают с гибелью при данной патологии.

Уровень экспрессии генов цитокинов в тканях органов мышей группы «Модель» сравнивали с таковым группы «Интактные», чтобы оценить статистическую адекватность модели состояния эндотоксического шока.

Оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, в ткани легких. Прежде всего, мы оценивали уровень экспрессии мРНК гена, кодирующего TNF- α , являющийся основным индуктором воспаления при развитии септического шока. На рисунке 60 показан уровень экспрессии генов *Tnfa* и *Il1b* в тканях легких мышей через час после введения LPS.

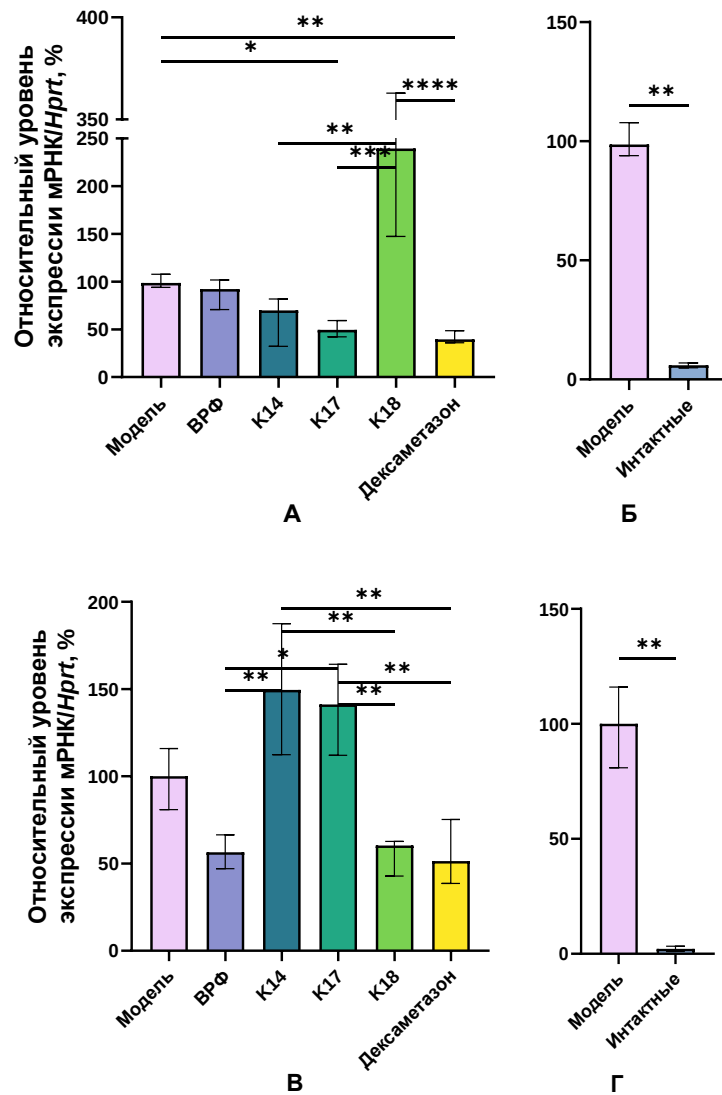


Рисунок 60 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Tnfa* (А и Б) и *Il1b* (В и Г) в легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и В и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б и Г. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано, что уровень экспрессии гена *Tnfa* в тканях легких мышей группы «Модель» статистически значимо выше такового групп «Интактные» (выше в 16,7 раз) и «Дексаметазон» (выше в 2,4 раза), что свидетельствует о правильно подобранном протоколе моделирования состояния эндотоксического шока и правильно подобранном препарате положительного контроля (дексаметазон), соответственно. Важно отметить достоверное снижение уровня экспрессии гена провоспалительного цитокина *Tnfa* в 1,6 раза у мышей в группе «K17» по сравнению с группой «Модель», что может говорить о противовоспалительной активности данного комплекса и коррелирует со снижением смертности и восстановлением веса у животных, получавших его. Уровень экспрессии гена в тканях легких мышей группы «K18» превышал таковой группы «Модель» в 2 раза, хотя с внешними проявлениями в самочувствии животных, в том числе относительно набора веса это не коррелировало. Следует отметить, в литературе описано, что в первую фазу развития сепсиса (период гипервоспаления), с которой совпадало время забора патологического материала (через 1 час после введения LPS), наблюдается чрезмерная выработка провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1b, IL-6, наличие которой не всегда коррелирует с плохим прогнозом при развитии септического процесса. Однако, длительность гипервоспаления может говорить в пользу негативного исхода [293].

Далее мы оценивали уровень экспрессии мРНК гена другого провоспалительного цитокина, *Il1b*, избыточная продукция которого связана с развитием шока, полиорганной недостаточности и смерти. Было выявлено повышение уровня экспрессии данного гена для всех групп, где животные получали инъекцию LPS. Уровень экспрессии мРНК *Il1b* в группе «Модель» статистически значимо превышал таковой группы «Интактные» в 50 раз, а уровень экспрессии *Il1b* в группах «K14» и «K17» достоверно превышал таковой групп «ВРФ», «K18» и «Дексаметазон» (в 2,5 и 2,8 раз). Полученные данные свидетельствуют о наличии мощного воспалительного процесса и отсроченности

противовоспалительной активности комплексов ввиду полученных ранее данных о выживаемости животных и успешном наборе ими веса.

В легких, как в наиболее восприимчивом к повреждению при септическом шоке органе-мишени, раньше других органов развивается выраженное воспаление с неконтролируемой продукцией провоспалительных цитокинов [255]. Забор экспериментального материала проводили через час после индукции состояния эндотоксического шока, когда, вполне возможно, чрезмерная экспрессия *Tnfa* и *Il1b* преобладала над противовоспалительной активностью исследуемых соединений. Однако, уже на этом этапе мы наблюдали снижение экспрессии *Tnfa* в группах «K14», «K17», «Дексаметазон» и снижение экспрессии *Il1b* в группах «ВРФ» и «K18», что позволяет предположить наличие у фуллерена C60 и комплексов на его основе способности подавлять экспрессию данных генов при развитии состояния эндотоксического шока.

Далее, в рамках данной работы была проанализирована экспрессия клетками легких мышей мРНК генов *Il6* и *Ifng*. На рисунке 61 представлена экспрессия этих генов через час после введения животным LPS.

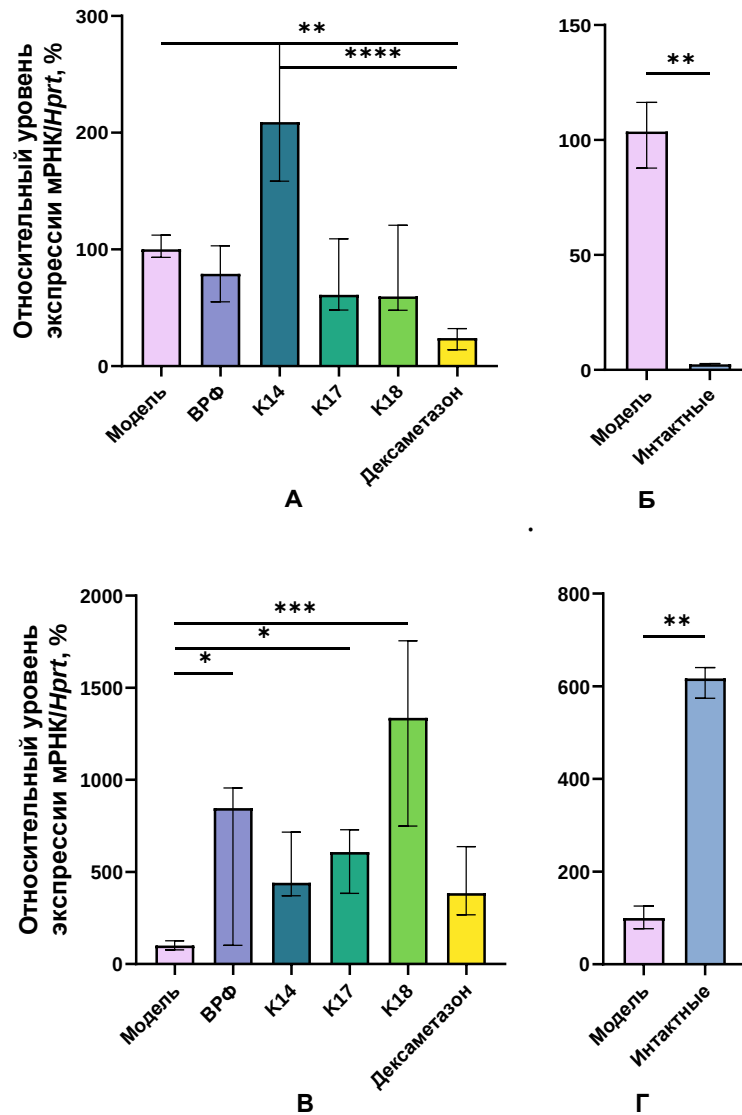


Рисунок 61 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il6* (А и Б) и *Ifng* (В и Г) в легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и В и непараметрического критерия Манна-Уитни для Б и Г.

«ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано увеличение экспрессии гена *Il6* у всех экспериментальных групп мышей, для которых было смоделировано состояние эндотоксического шока (группы «Модель», «ВРФ», «K14», «K17», «K18» и «Дексаметазон»). Показано достоверное различие между животными групп «Модель» и «Интактные» (более, чем в 100 раз), а также между группами «Модель» и «Дексаметазон» (более, чем в 2 раза). Уровень экспрессии гена *Il6* в клетках легких животных, получавших профилактическое введение раствора комплекса K14 (группа «K14»), статистически значимо превышал таковой группы «Дексаметазон», что коррелирует с данными о смертности в этой группе, поскольку уровень экспрессии гена *Il6*, как правило, связывают с высоким риском летального исхода при сепсисе [160]. Данные, полученные об экспрессии *Il6*, согласуются с таковыми для *Tnfa* и *Il1b*, согласуются с литературными данными и свидетельствуют о прямом влиянии TNF- α и IL-1 на высвобождение IL-6.

Также в тканях легких мышей оценивали экспрессию гена *Ifng*. Был показан достоверный рост уровня экспрессии мРНК данного гена для групп «ВРФ», «K17» и «K18» в сравнении с таковым группы «Модель» на 860 %, 1100 % и 490 %, соответственно. Важно отметить, что было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии *Ifng* в образцах легких группы «Модель» относительно интактной группы в 6 раз, что говорит о понижении уровня экспрессии *Ifng* при моделировании состояния эндотоксического шока. Полученные данные согласуются с описанными в литературе случаями тяжелого сепсиса у людей, когда наблюдали нарушение продукции IFN- γ CD8⁺ Т-лимфоцитами. На модели тяжелого сепсиса у мышей было показано нарушение транскрипции IFN- γ в CD8⁺ Т-клетках вследствие ограничения доступа к локусу *Ifng* [78]. Повышение экспрессии данного гена при внутрибрюшинном введении ВРФ и раствора K18 относительно группы «Модель», по-видимому, связано с протективным эффектом этих соединений в отношении популяции CD8⁺ Т-клеток.

Сравнительная оценка уровня экспрессии гена *Il10* в ткани легких мышей показана на рисунке 62.

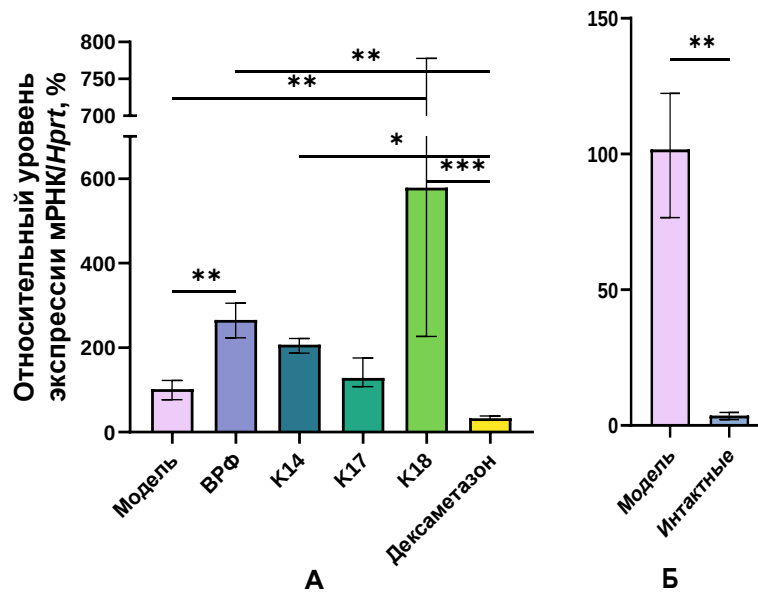


Рисунок 62 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il10* в легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и непараметрического критерия Манна-Уитни для Б. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

В процессе исследования было выявлено повышение уровня экспрессии *Il10* в легких мышей групп «ВРФ», «K14», «K17», «K18» относительно животных модельной группы на 137 %, 40 %, 52 % и 457 %, соответственно. Уровень экспрессии мРНК *Il10* в легочной ткани мышей групп «ВРФ» и «K18» статистически значимо отличался от такового животных группы «Модель».

Высокий уровень экспрессии *Il10* является маркером ранней смерти в совокупности с низкой экспрессией *Tnfa* [68]. Исходя из этого, повышение экспрессии *Il10* в группе «K18» не является предиктором неблагоприятного

исхода заболевания, поскольку коррелирует с высоким уровнем экспрессии *Tnfa*. Поскольку IL-10 подавляет продукцию TNF- α , можно предположить, что уровень *Il10* в группе «K18» был повышен в ответ на высокий уровень *Tnfa* в той же группе. Для анализа течения сепсиса и септического шока можно рассчитать соотношение IL-10/TNF- α . Высокое соотношение IL-10/TNF- α связано с неблагоприятным исходом при развитии септического шока, что позволяет интерпретировать сопоставимые уровни экспрессии групп «K14», «K18» и «Модель» как положительный результат терапии.

Соотношение *Il10/Tnfa* показано на рисунке 63.

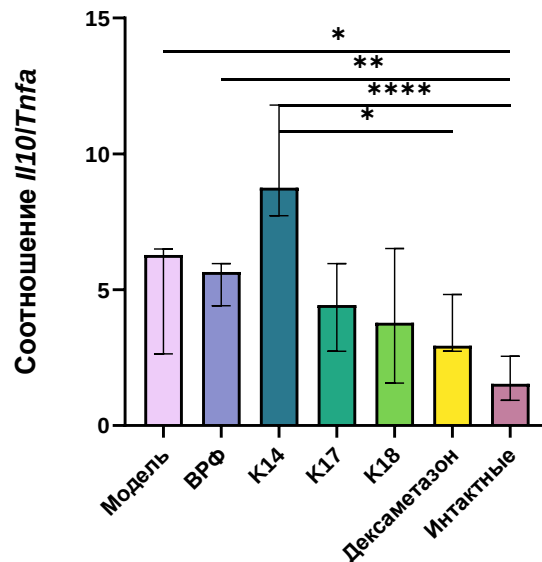


Рисунок 63 – Соотношение *Il10/Tnfa*, определенное для легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$.

Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия

Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS;

«K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS;

«Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Было выявлено повышение указанного соотношения в группах животных, получавших LPS («Модель», «ВРФ», «K14», «K17», «K18», «Дексаметазон»), по сравнению с интактной группой. На графике видно, что в группах «Модель», «ВРФ» и «K14» наблюдалось наибольшее повышение соотношения (в 4,2, 3,8 и 5,9 раз, соответственно) относительно группы «Интakтные». Данный показатель в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» превышал таковой интактной группы в 2,9, 2,5 и 1,9 раз, соответственно. Согласно полученным результатам, введение K17, K18 и дексаметазона мышам могло привести и привело, как показано ранее, к благоприятному исходу заболевания.

Далее мы оценивали уровень экспрессии мРНК гена, кодирующего антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA) – *Il1rn* (рисунок 64).

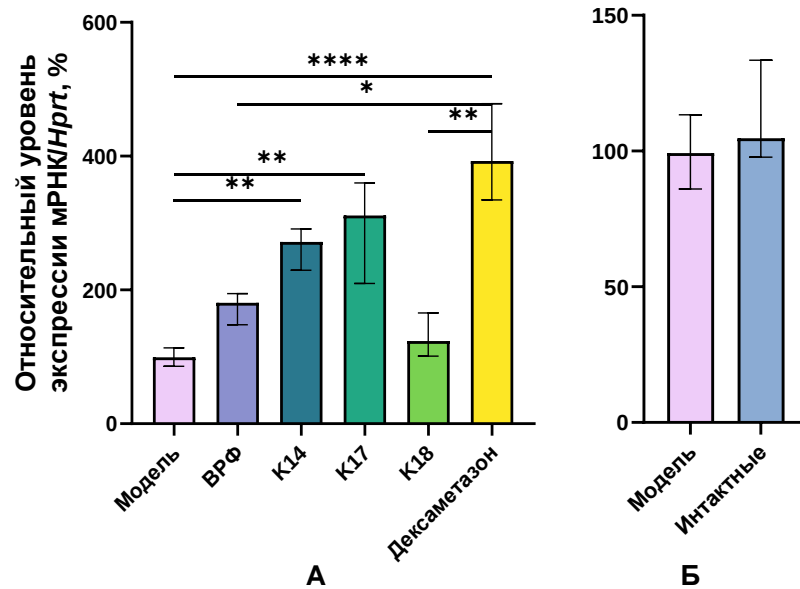


Рисунок 64 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il1rn* в легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Известно, что IL-1 действует аутокринно или паракринно через рецептор IL-1 типа I, в то время как IL-1RA действует как ингибитор рецептора этого провоспалительного цитокина. Было показано достоверное повышение уровня экспрессии гена *Il1rn* в группах «K14», «K17» и «Дексаметазон» относительно такого уровня группы «Модель» на 172 %, 246 % и 308 %, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о способности комплексов K14 и K17 положительно влиять на экспрессию данного противовоспалительного цитокина, в то время как комплекс K18, вероятно, не оказывал влияния на уровень

экспрессии *Il1rn* на момент забора экспериментального материала. Чтобы оценить влияние K18 на экспрессию *Il1rn* более точно, был проведен расчет соотношения *Il1rn/Il1b*, которое используется для оценки вероятности благоприятного исхода при развитии септического шока (рисунок 65).

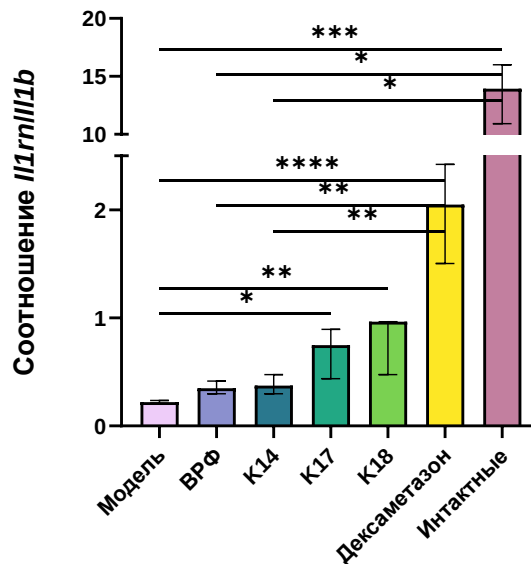


Рисунок 65 – Соотношение *Il1rn/Il1b*, определенное для легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Высокое соотношение *Il1rn/Il1b* коррелирует с выживаемостью при развитии состояния эндотоксического шока [233]. На графике видно, что индекс *Il1rn/Il1b* в группах «ВРФ» и «K14» находится примерно на одном уровне с группой «Модель», что говорит о несколько повышенных рисках гибели животных данных групп и согласуется с результатами оценки выживаемости

животных (раздел 3.7.1). Так, было показано, что в группах «ВРФ» и «K14» процент выживаемости составил 87,5 % и 75 %. Очевидное повышение индекса *Il1rn/Il1b* в группах «K17» и «K18» относительно модельных животных в 3,5 и 5 раз, соответственно, может говорить о более высоких шансах благоприятного исхода для животных этих групп и коррелирует с данными выживаемости, полученными в рамках данного эксперимента (100 % выживаемость в группах «K17» и «K18»).

После была проведена оценка уровня экспрессии гена рецептора аденозина A2 - *Adora2a* (рисунок 66).

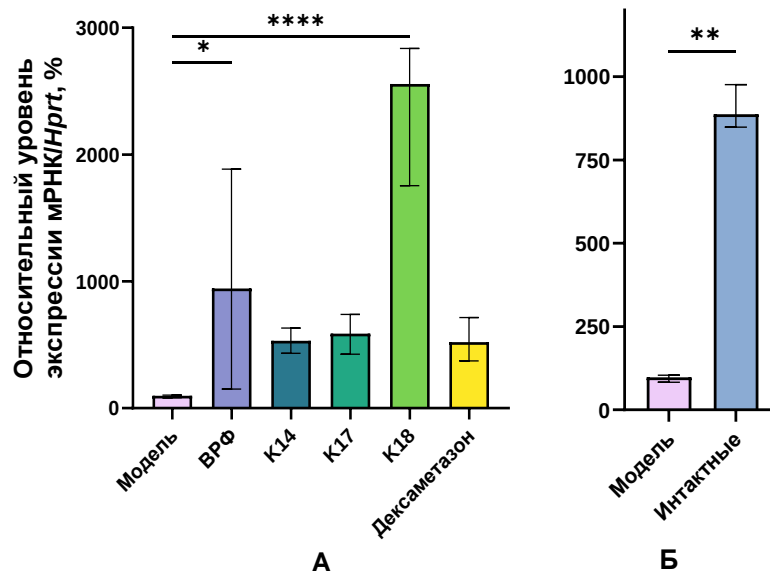


Рисунок 66 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Adora2a* в легочной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Мы наблюдали снижение уровня экспрессии *Adora2a* во всех группах, получавших инъекцию LPS, за исключением групп «ВРФ» и «K18», относительно группы «Интактные». Уровень экспрессии гена в указанных группах превышал таковой группы «Интактные» на 600 % и 1600 %, соответственно, что коррелирует с данными о протективной роли стимуляции рецептора аденозина A2 в отношении органов при развитии сепсиса [56].

Полученные данные показали, что введение LPS приводит к снижению экспрессии гена *Adora2a*, что коррелирует с данными литературы [197]. Было продемонстрировано, что уровень экспрессии данного гена увеличивался относительно группы «Модель» при внутрибрюшинном введении ВРФ и комплекса K18. Поскольку активация гена рецептора аденозина A2 приводит к подавлению продукции TNF- α [304], можно сделать вывод о способности ВРФ и K18 подавлять экспрессию *Tnfa* в последующие дни после введения LPS, то есть речь может идти о наличии отсроченного противовоспалительного эффекта данных соединений.

В ходе исследования мы также оценивали уровень экспрессии гена *Il4*. Ген цитокина IL-4 был отобран для анализа, поскольку в литературе описаны неоднозначные данные о влиянии его продукта на выживаемость животных и человека при сепсисе. Однако уровни экспрессии мРНК гена *Il4* оказались низкими и не детектировались методом ПЦР-РВ, что подтверждает экспрессию данного цитокина на более поздних этапах воспаления, опосредованного LPS [20].

Таким образом, показано, что исследуемые соединения были способны влиять на экспрессию провоспалительных и противовоспалительных факторов, участвующих в развитии LPS-индуцированного системного воспаления в легочной ткани. Внутрибрюшинное введение K14 и K17 способствовало снижению экспрессии *Tnfa*, а ВРФ и K18 подавляли экспрессию *Il1b*. Применение ВРФ и комплексов приводило к повышению уровня *Ifng*, что в условиях развития

септического шока также может свидетельствовать о наличии у исследуемых соединений противовоспалительной активности. Был показан также тренд к повышению экспрессии *Il10* и *Il1rn* в группах животных, получавших водный раствор фуллерена C60 и комплексы на его основе. Исследование соотношений *Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b* показало, что наиболее благоприятный прогноз исхода заболевания можно было ожидать у мышей групп «K17» и «K18», что являлось подтверждением ранее описанных данных о выживаемости животных.

Оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, в ткани почек. Еще одним важным органом-мишенью, поражаемым при сепсисе, являются почки. Острое повреждение почек развивается примерно у двух третей пациентов с септическим шоком и часто рассматривается как ранний признак сепсиса [172]. В связи с этим, была проведена оценка уровня экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных факторов в тканях почек мышей с LPS-индуцированным шоком. На рисунке 67 представлен относительный уровень экспрессии генов *Tnfa* и *Il1b* через час после введения LPS.

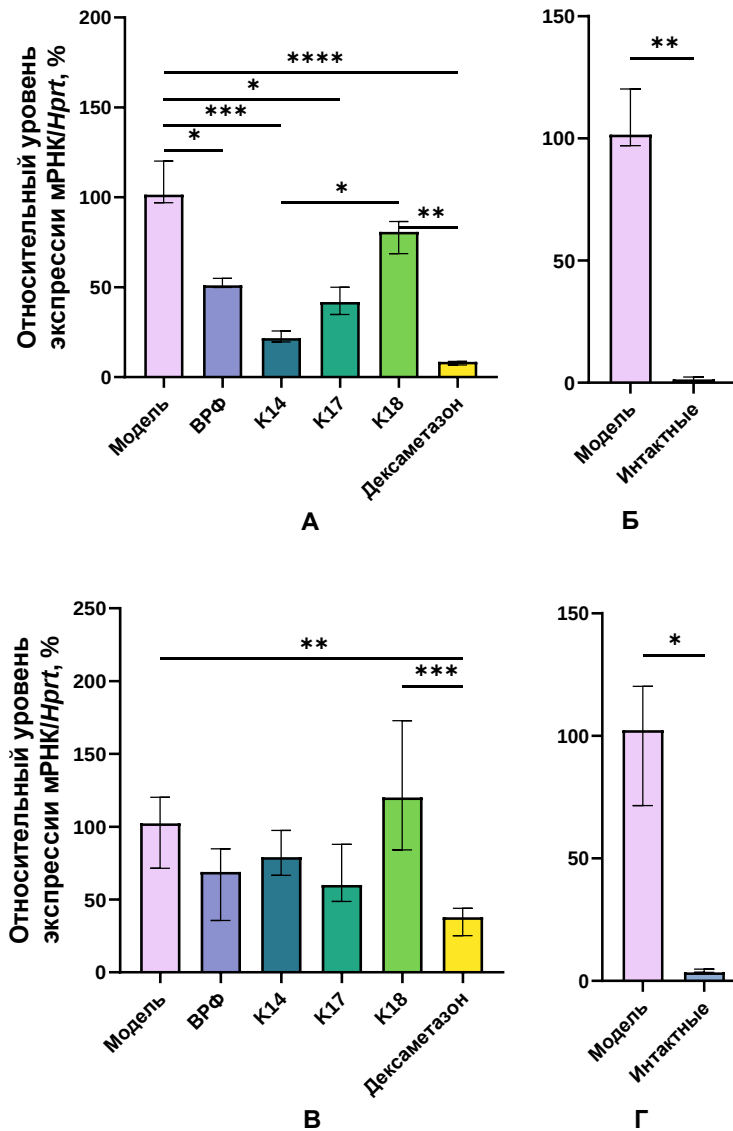


Рисунок 67 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Tnfa* (А и Б) и *Il1b* (В и Г) в почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и В и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б и Г.

«БРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием БРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано достоверное повышение уровня экспрессии мРНК *Tnfa* в группе «Модель» относительно таковой групп «Дексаметазон» и «Интактные» в 67 и 10 раз, соответственно, что подтверждает релевантность модели заболевания и правильный подбор положительного контроля, в качестве которого использовали глюкокортикостероид (дексаметазон). Также выявлено, что уровень экспрессии данного гена в тканях почек животных групп «ВРФ», «K14» и «K17» был статистически значимо ниже, чем в группе «Модель», на 32 %, 73 % и 63 %, соответственно. Полученные данные позволяют сделать вывод, что ВРФ и комплексы K14 и K17 способны подавлять экспрессию *Tnfa* в почках мышей при развитии эндотоксического шока.

Что касается *Il1b*, то наблюдалась повышение экспрессии данного гена в образцах почек мышей, получивших инъекцию эндотоксина, относительно группы «Интактные». Также в группах «ВРФ», «K14», «K17» и «Дексаметазон» было выявлено снижение уровня экспрессии *Il1b* по сравнению с модельной группой, что позволяет предположить наличие у фуллерена C60 и комплексов K14 и K17 способности подавлять экспрессию данного гена в тканях почек.

Исходя из полученных данных по экспрессии *Tnfa* и *Il1b*, можно сделать вывод о развитии воспалительного ответа в почках мышей с эндотоксическим шоком уже через 1 час после введения LPS (80 мкг/мышь). Однако следует отметить, что выраженность данного воспаления была несопоставима с таковой в легких. Известно, что уровень экспрессии *Tnfa* и *Il1b* в тканях почек при развитии септического шока обычно ниже по сравнению с тканями легких и печени, что мы и наблюдали в данном эксперименте.

Далее, на рисунке 68 показана сравнительная оценка уровня экспрессии генов *Il6* и *Ifng*.

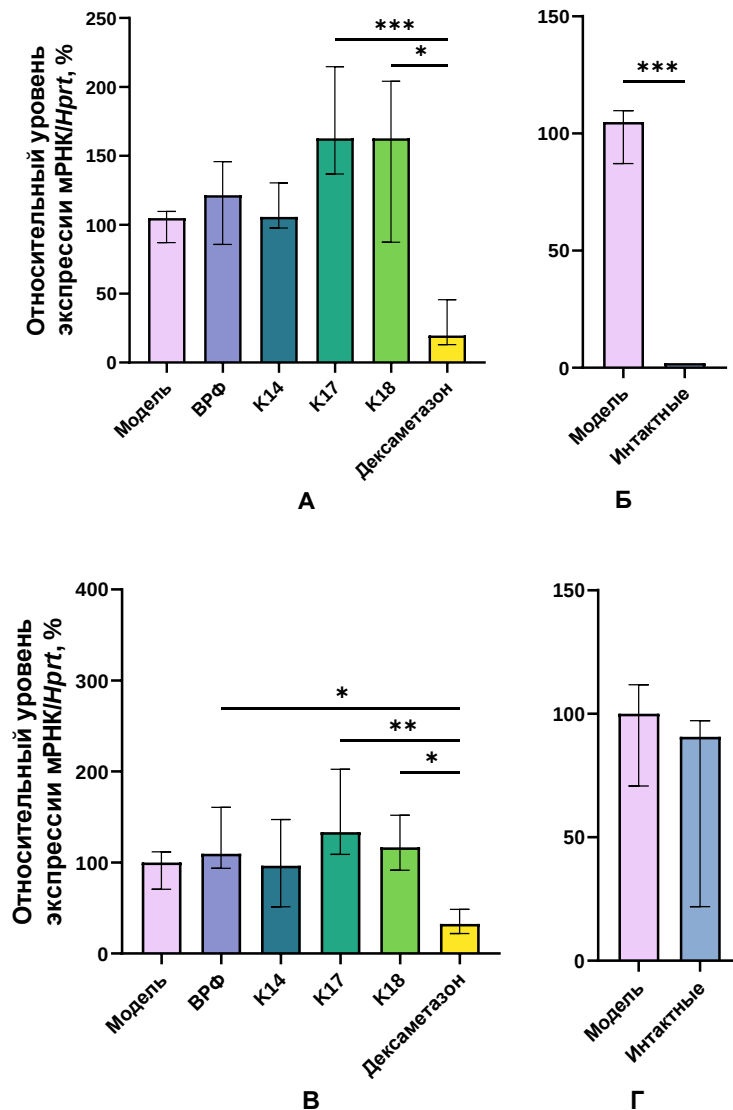


Рисунок 68 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il6* (А и Б) и *Ifng* (В и Г) в почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и В и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б и Г. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Уровень экспрессии *Il6* в почках часто описывается как более высокий, чем в легких. В своей работе мы подтвердили данные литературы выраженном повышении экспрессии данного гена в тканях почек по сравнению с тканями легких. На фоне мощного воспаления было показано отсутствие влияния исследуемых комплексов на экспрессию *Il6* через 1 час после введения животным LPS.

Было выявлено, что ВРФ и комплексы K14, K17 и K18 не влияли на экспрессию мРНК гена *Ifng* в почках через 1 час после введения эндотоксина. На экспрессию мРНК *Ifng* при развитии септического шока могут влиять повреждение клеток-продуцентов IFN- γ , например CD8⁺ Т-лимфоцитов, приводящее к нарушению их способности экспрессировать одноименный ген, а также цитокины, секретируемые макрофагами. В частности, индукция экспрессии *Ifng* регулируется TNF- α . Поскольку в тканях почек мышей наблюдают более низкий уровень экспрессии *Tnfa*, чем в тканях легких и печени, это может привести к увеличению экспрессии *Ifng* в более поздние сроки, чем в указанных органах. Также можно предположить, что наблюдаемое в тканях легких снижение экспрессии *Ifng* опережает иммунный ответ в почках.

На рисунке 69 представлен относительный уровень экспрессии гена противовоспалительного цитокина IL-10 в почечной ткани мышей с эндотоксическим шоком.

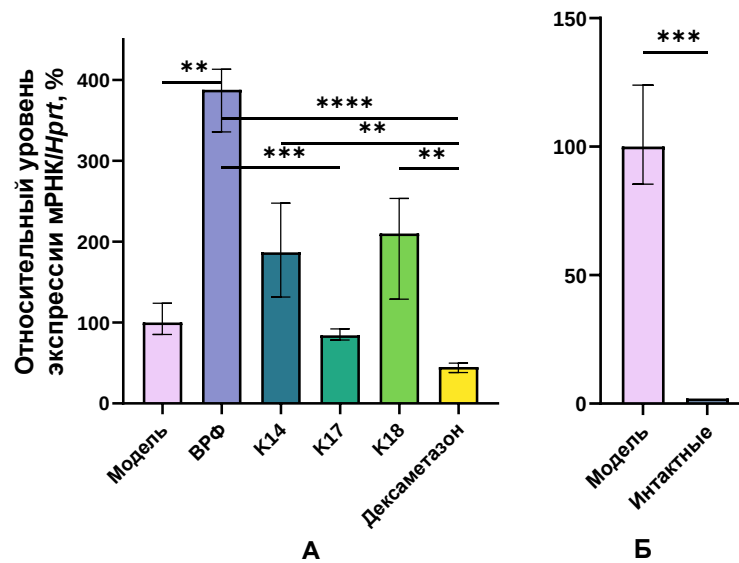


Рисунок 69 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il10* в почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

На графике видно, что экспрессия указанного гена в тканях почек мышей групп «ВРФ», «K14» и «K18» была увеличена в 3,9, 1,9 и 2,1 раза, соответственно, по сравнению с группой «Модель». Также было показано снижение экспрессии *Il10* в группах «K17» и «Дексаметазон». Ввиду неоднозначности влияния IL-10 на течение эндотоксического шока, было принято решение оценивать уровень экспрессии гена данного цитокина в совокупности с уровнем экспрессии гена его антагониста – TNF- α .

Известно, что для оценки прогноза септического шока вычисляется соотношение $Il10/Tnfa$, а высокое соотношение $Il10/Tnfa$ считается предиктором повышенного риска смерти [68]. С целью оценить прогноз развития заболевания, который может быть обусловлен степенью повреждения почек, был проведен расчет данного соотношения для всех экспериментальных групп (рисунок 70).

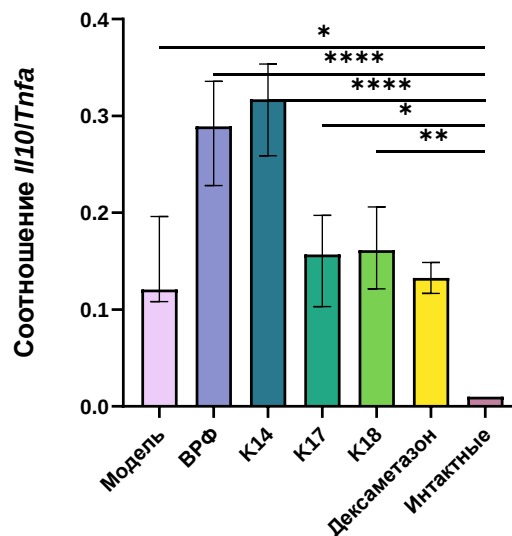


Рисунок 70 – Соотношение $Il10/Tnfa$, определенное для почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана ± интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$.

Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия

Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

На графике показано повышение соотношения $Il10/Tnfa$ в группах «ВРФ» и «K14». Это позволяет предсказать наиболее неблагоприятный прогноз патологии у мышей, получавших ВРФ и K14, относительно животных других групп, где предусматривалось проведение терапии («K17», «K18», «Дексаметазон»). Важно

отметить, что рисунок 51, полученный на основании расчета соотношения $Il10/Tnfa$, не отражает данные по выживаемости мышей (раздел 3.7.1) в полной мере. Так, соотношение $Il10/Tnfa$ в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» было сопоставимо с таковым группы «Модель», хотя выживаемость животных в модельной группе составила 0 %, а в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» - 100%.

Поскольку известно, что уровень экспрессии $Tnfa$ в тканях почек при развитии септического шока обычно ниже по сравнению с другими органами, а забор патматериала был осуществлен через час после введения LPS, можно предположить, что расчет соотношения $Il10/Tnfa$ на основе данных, полученных из образцов почек на раннем этапе развития септического шока, не является информативным и релевантным при прогнозировании течения данной патологии.

Далее была проведена оценка уровня экспрессии мРНК гена антагониста рецептора IL-1 ($Il1rn$) (рисунок 71).

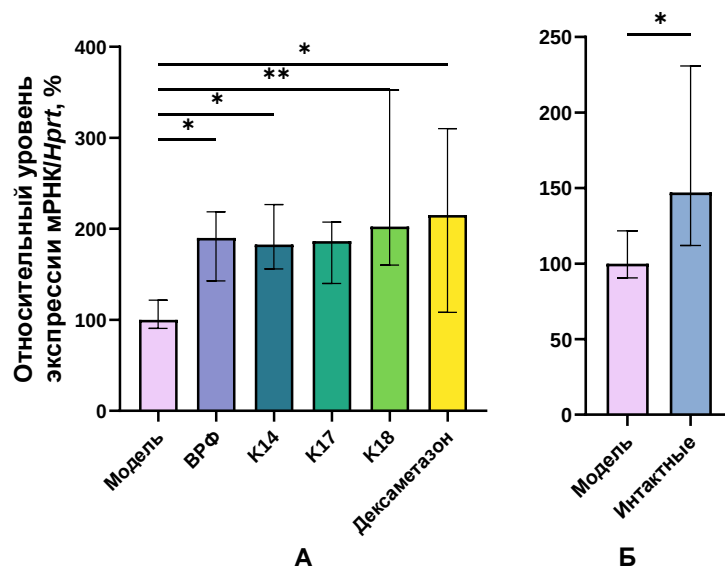


Рисунок 71 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il1rn* в почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

На основании полученных данных было выявлено статистически значимое повышение уровня экспрессии *Il1rn* в группах, где животные получали профилактическую терапию исследуемыми соединениями (группы «ВРФ», «K14», «K18» и «Дексаметазон»), на 90 %, 83 %, 103 % и 115 %, соответственно. Повышение экспрессии *Il1rn*, вероятно, способствовало выживанию мышей вследствие препятствования IL-1b-опосредованному развитию воспалительных реакций в почках.

Антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA, ген *Il1rn*) представляет собой модулятор действия одноименного провоспалительного цитокина. Известно, что введение IL-1RA экзогенного происхождения способствует увеличению выживаемости при септическом шоке [235]. Соотношение *Il1rn/Il1b*

рассчитывают для прогнозирования развития септического шока, где увеличение соотношения соответствует благоприятному прогнозу. Для визуализации результатов было принято решение рассчитать указанное соотношение и представить в виде графика (рисунок 72).

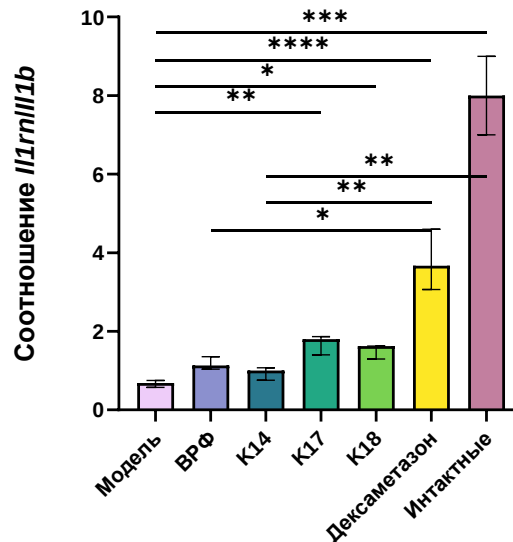


Рисунок 72 – Соотношение $Il1rn/Il1b$, определенное для почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

На графике видно, что индекс $Il1rn/Il1b$ групп «K17» и «K18» статистически значимо превышал таковой, рассчитанный для модельной группы в 3 и 2 раза, соответственно. Это свидетельствует о положительном прогнозе для животных указанных групп. Полученные данные подтверждают положительный прогноз

относительно выживаемости животных с моделированным состоянием эндотоксического шока, получавших терапию K17, K18 и дексаметазоном.

Предполагается, что активация рецептора аденозина A2a способствует увеличению вероятности выживаемости мышей при развитии эндотоксического шока, то есть данный рецептор имеет важное терапевтическое значение [291]. В связи с этим была проведена оценка уровня экспрессии соответствующего гена (*Adora2a*) в тканях почек мышей через 1 час после введения эндотоксина (рисунок 73).

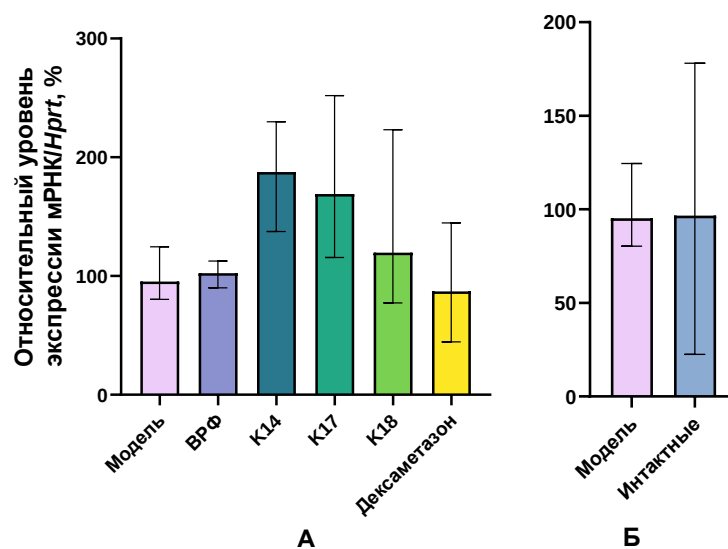


Рисунок 73 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Adora2a* в почечной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Уровень экспрессии гена в группе «Модель» не отличался от такового группы «Интактные», что вероятно, связано с менее выраженным воспалительным ответом в тканях почек по сравнению с тканями легких.

Несмотря на отсутствие статистически значимого изменения экспрессии данного гена, было выявлено повышение экспрессии *Adora2a* в группах «K14», «K17» и «K18» относительно группы «Модель».

Известно, что уровень экспрессии *Adora2a* обратно коррелирует с экспрессией гена *Tnfa*. На рисунках 67 и 73 показано, что повышение экспрессии мРНК *Adora2a* в тканях почек мышей при моделировании состояния эндотоксического шока сопровождалась понижением экспрессии *Tnfa* в тех же группах мышей.

В данных литературы описано, что экспрессия мРНК *Il4* может быть связана с увеличением вероятности выживаемости пациентов с тяжелым сепсисом [292], вследствие чего было принято решение оценить уровень экспрессии данного гена в тканях почек мышей с моделированным состоянием эндотоксического шока. Уровень экспрессии мРНК *Il4* в почечной ткани мышей с LPS-индуцированным шоком был ниже уровня детекции используемого метода, что, вероятно, связано с более поздними сроками экспрессии данного гена в почках, также как и было показано для ткани легких.

По совокупности представленных данных по экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных факторов можно сделать вывод, что исследуемые препараты в разной степени проявляли противовоспалительный эффект. Было выявлено снижение уровня экспрессии мРНК генов *Tnfa* и *Il1b* в группах, где животные получали терапию на основе ВРФ и комплексов K14, K17, K18, относительно группы «Модель». Было показано повышение экспрессии гена противовоспалительного цитокина *Il10* в группах «ВРФ», «K14» и «K18» относительно группы «Модель», а также повышение уровня экспрессии *Il1rn* во всех группах, где животные получали терапию исследуемыми соединениями, что свидетельствовало о подавлении воспалительного процесса. В целом, воспаление в тканях почек было выражено слабее, чем в тканях легких, однако результаты, полученные на основе расчетов соотношений *Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b*, позволяют

сделать вывод о наиболее благоприятном прогнозе развития септического шока в группах «K17» и «K18».

Оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, в ткани печени. На следующем этапе исследования была проведена оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, при моделировании состояния эндотоксического шока в печени. Печень является критически важным органом для выживания организма-хозяина при развитии тяжелой патологии, подобной септическому шоку. Дисфункция и повреждение печени напрямую способствуют прогрессированию заболевания и смерти.

На рисунке 74 представлены результаты анализа уровня экспрессии мРНК *Tnfa* и *Il1b*.

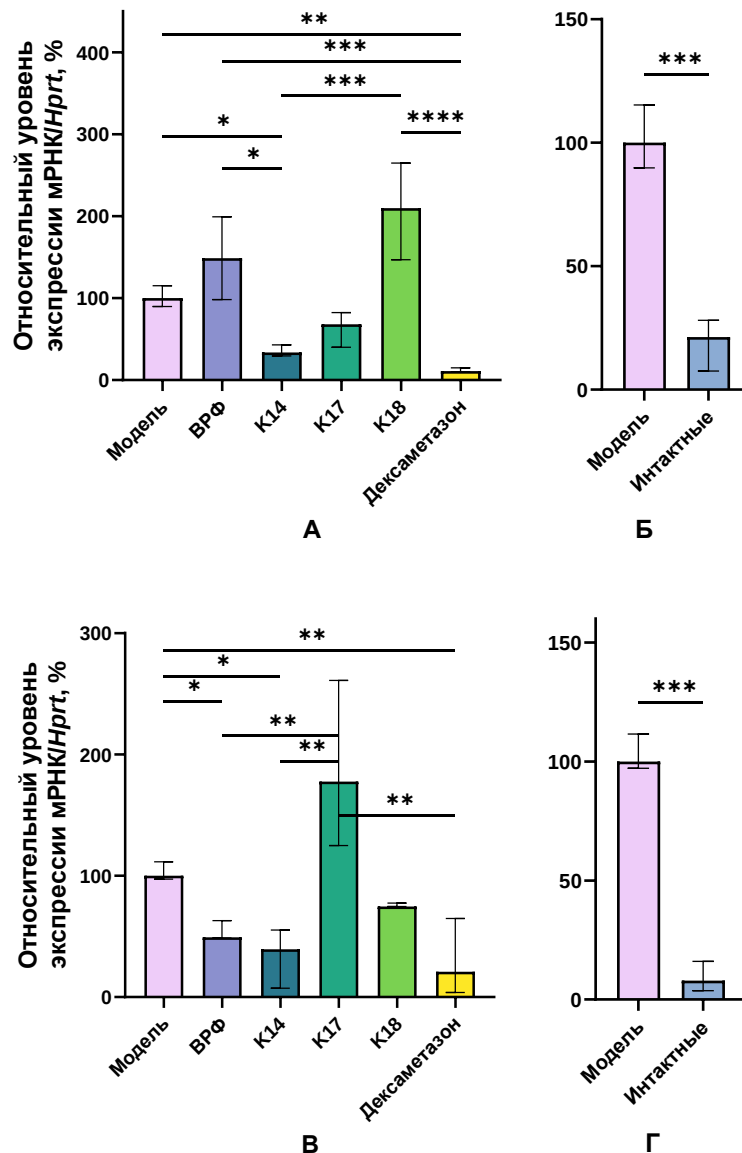


Рисунок 74 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Tnfa* (А и Б) и *Il1b* (В и Г) в ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана для А и В и непараметрического критерия Манна–Уитни для Б и Г.

«БРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием БРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интakтные» - введение препаратов животным не проводилось

Уровень экспрессии *Tnfa* в образцах печени животных группы «Модель» превышал таковой группы «Интактные» в 5 раз, что говорит о наличии воспалительного ответа в тканях печени животных с индуцированным состоянием эндотоксического шока и было предусмотрено данной схемой моделирования заболевания. В группах «K14», «K17» и «Дексаметазон» было показано снижение уровня экспрессии данного гена в 3, 1,5 и 10 раз, соответственно, относительно таковой группы «Модель». Полученные данные позволяют сделать вывод, что комплексы K14 и K17 подавляют экспрессию гена провоспалительного цитокина *Tnfa*. Показанное на графике повышение уровня экспрессии *Tnfa* в группах «ВРФ» и «K18» свидетельствует о развивающемся воспалительном процессе и нуждается в совместном рассмотрении с данными по экспрессии *Il10*, чтобы оценить прогноз течения заболевания.

В ходе оценки уровня экспрессии гена *Il1b* было показано достоверное снижение экспрессии у животных, получавших ВРФ и K14, на 40 % и 61 %, соответственно, относительно группы «Модель». Уровень экспрессии *Il1b* в образцах печени животных группы «Модель» превышал таковой группы «Интактные» в 10 раз, что подтверждает наличие воспалительного ответа в печени при моделировании состояния эндотоксического шока.

Что касается уровня экспрессии мРНК гена *Il6*, то для образцов печени животных большинства групп (за исключением группы «Модель») он находился ниже допустимого уровня детекции методом ПЦР-РВ (данные не представлены), что делает невозможным сравнение групп. Поскольку продукция IL-6 может быть вызвана TNF- α , можно предположить, что *Il6* экспрессировался в тканях печени в малых количествах ввиду недостатка TNF- α в микроокружении через 1 час после введения животным летальной дозы LPS.

Далее в образцах печени мышей с LPS-индуцированным шоком определяли уровень экспрессии *Ifng* (рисунок 75).

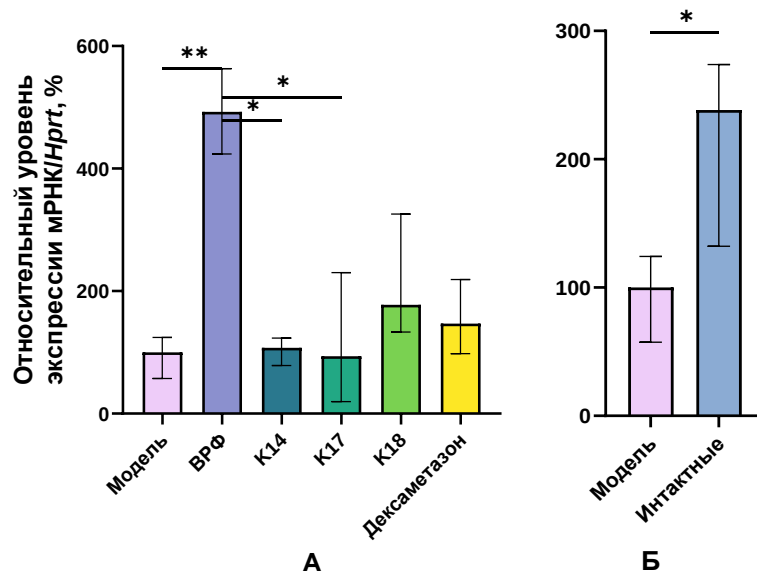


Рисунок 75 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Ifng* в ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Показано снижение уровня экспрессии гена в образцах экспериментальных групп, за исключением группы «ВРФ», относительно группы «Интактные», что согласуется с данными литературы о нарушении функций $CD8^+$ Т-лимфоцитов при развитии сепсиса, в частности их способности продуцировать IFN- γ [78]. Также был выявлен высокий уровень экспрессии *Ifng* в тканях печени животных, получавших терапию на основе водного раствора фуллерена C60 (группа «ВРФ»).

Описаны случаи использования экзогенного IFN- γ для предотвращения иммуносупрессии, характерной для второго, после гипервоспаления, этапа эндотоксического шока [108, 226]. Полученные результаты позволяют предположить, что введение водного раствора фуллерена C60 может

препятствовать подавлению экспрессии *Ifng* CD8⁺ Т-лимфоцитами под действием LPS и предотвращать развитие иммуносупрессии.

На рисунке 76 показаны результаты оценки уровня экспрессии мРНК *Ii10* в тканях печени.

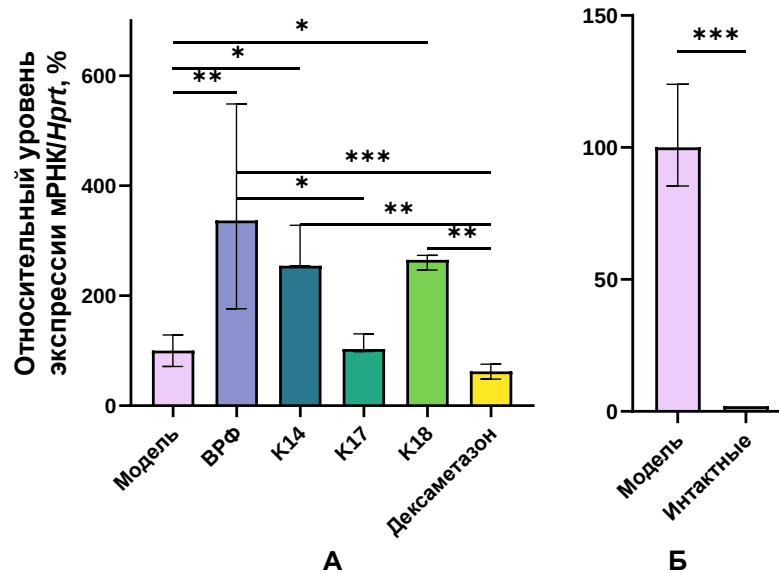


Рисунок 76 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Ii10* в ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; n = 8). Примечание: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Выявлено повышение уровня экспрессии данного гена в группах, где животные получали инъекцию эндотоксина, относительно такового здоровых животных (группа «Интактные»). Уровень экспрессии гена в печени мышей групп «ВРФ», «K14» и «K18» был выше такового группы «Модель» на 256 %, 177 % и 202 %, соответственно, что говорит о противовоспалительной активности указанных соединений.

Данные по экспрессии *Il10* также были проанализированы в совокупности с данными по экспрессии *Tnfa*. Для прогнозирования течения системного воспаления рассчитывают соотношение *Il10/Tnfa*, а повышение соотношения связывают с неблагоприятным прогнозом и увеличением риска гибели пациента или животного. Результаты расчета соотношения представлены на рисунке 77.

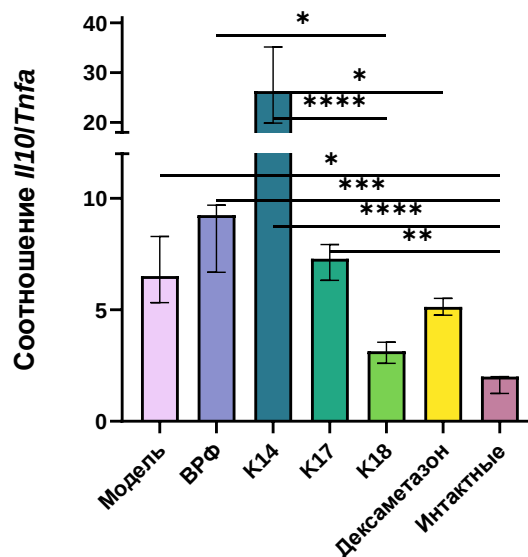


Рисунок 77 – Соотношение *Il10/Tnfa*, определенное для ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана ± интерквартильный размах; n = 8). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано повышение соотношения *Il10/Tnfa* в группах «ВРФ», «К14» и «К17» относительно группы модель на 2,8, 19,8 и 0,8, соответственно. Полученные результаты не коррелировали с данными выживаемости мышей при моделировании состояния эндотоксического шока, что позволяет выдвинуть

предположение о нецелесообразности использования соотношения *Il10/Tnfa* как предиктора летальности на ранних этапах развития системного воспаления.

Далее в тканях печени оценивали уровень экспрессии мРНК гена *Il1rn* (рисунок 78).

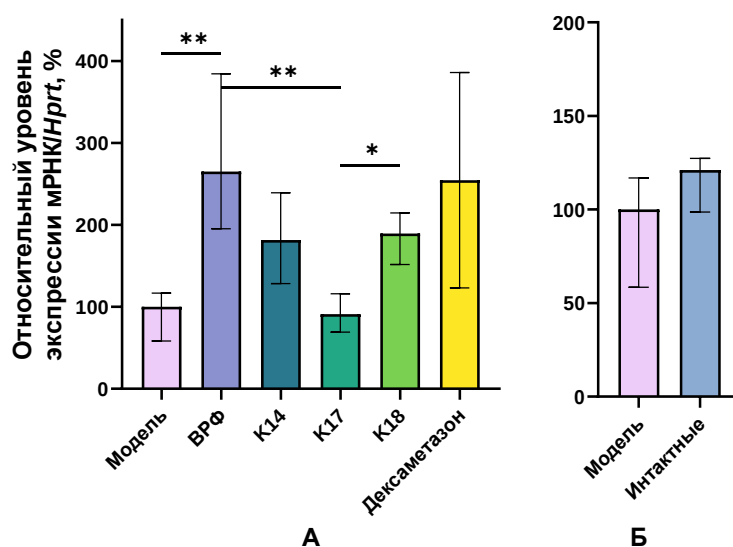


Рисунок 78 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Il1rn* в ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «K18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса K18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано статистически значимое повышение уровня экспрессии в группе «ВРФ» относительно группы «Модель» на 284 %. В то же время, уровень экспрессии группы «Модель» не отличался достоверно от такового группы «Интактные». Полученные данные свидетельствуют о том, что терапия на основе водного раствора фуллерена C60 приводит к активации IL-1RA-опосредованного противовоспалительного ответа.

Для расчета прогноза выживаемости было рассчитано соотношение $Il1rn/Il1b$ (рисунок 79).

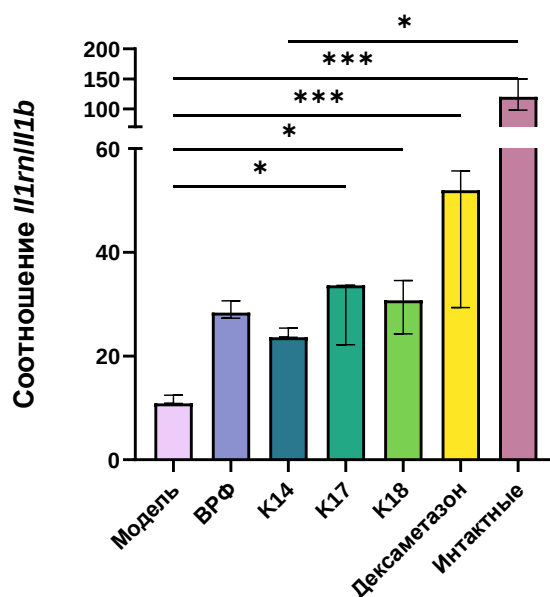


Рисунок 79 – Соотношение $Il1rn/Il1b$, определенное для печеночной ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; n = 8). Примечание: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; **** - p < 0,0001.

Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия

Краскелла-Уоллиса с последующим множественным сравнением групп между собой с использованием критерия Дана. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS;

«К17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К18» -

животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS;

«Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Показано статистически значимое повышение соотношения $Il1rn/Il1b$ в группах «К17» и «К18» относительно таковой модельной группы в три раза, что указывает на более высокую вероятность выживаемости животных, получивших терапию данными комплексами. Напротив, слабо выраженное повышение индекса (примерно в два раза) в группах «ВРФ» и «К14» относительно группы

«Модель» коррелировало с более высокой вероятностью неблагоприятного прогноза.

Далее определяли уровень экспрессии мРНК *Adora2a* в тканях печени мышей с индуцированным состоянием эндотоксического шока (рисунок 80).

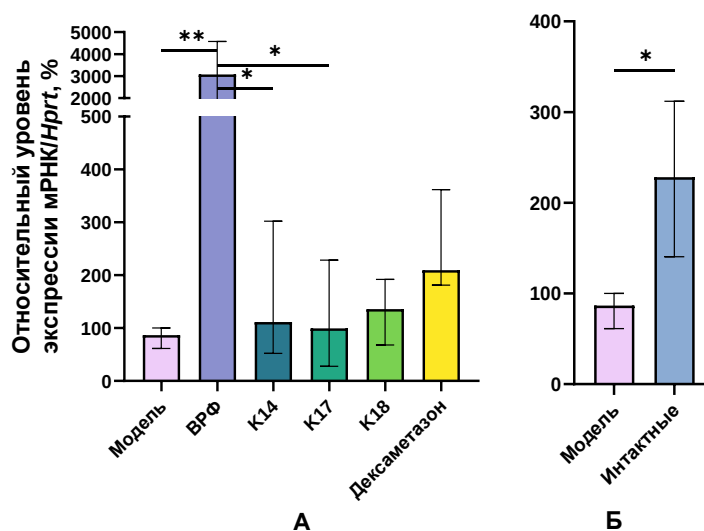


Рисунок 80. Относительный уровень экспрессии мРНК *Adora2a* в ткани печени мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. «ВРФ» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием ВРФ за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К14» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К14 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К17» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К17 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «К18» - животные получали инъекцию LPS и профилактическую терапию с использованием комплекса К18 за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS; «Интактные» - введение препаратов животным не проводилось

Было показано существенное снижение уровня экспрессии во всех экспериментальных группах, кроме группы «ВРФ», относительно интактных животных. Показатели группы «ВРФ» были выше таковых групп «Модель» и «Интактные» в 32 и 16 раз, соответственно.

Согласно полученным данным, можно предположить, что фуллерен C60 нормализует LPS-индуцированное подавление экспрессии *Adora2a* (группа "ВРФ") [197]. Поскольку активация аденозинового A2a-рецептора индуцирует

ингибирование синтеза TNF- α [304], можно предположить, что терапия на основе ВРФ способна опосредованно подавлять экспрессию *Tnfa* в отсроченный период после LPS-индуцированного воспаления.

Была проведена оценка экспрессии гена *Il4*, кодирующего одноименный цитокин. IL-4 представляет собой противовоспалительный фактор, продукция которого способствует выживаемости при развитии септического шока. В результате оценки уровня экспрессии мРНК гена *Il4* в тканях печени мышей с индуцированным эндотоксическим шоком наблюдалась картина, аналогичная таковой для тканей легких и почек. Уровни экспрессии данного гена были недостаточно высокими для детектирования методом ПЦР-РВ, что, вероятно, связано с ранним временем забора биологического материала, в то время как уровень экспрессии *Il4* начинает повышаться позднее.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что модель состояния эндотоксического шока на мышах была воспроизведена в полной мере, а цитокиновый профиль группы «Модель» соответствовал таковому, описанному в литературе для данной патологии [199].

Полученные результаты свидетельствовали о том, что исследуемые соединения влияли на уровень экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при развитии эндотоксического шока в печени и проявляли противовоспалительную активность. Было показано, что K14 и K17 подавляли экспрессию *Tnfa*, а введение животным ВРФ, K14 и K18 приводило к понижению экспрессии другого гена провоспалительного цитокина – *Il1b*. На основе результатов по экспрессии *Ifng* можно говорить о том, что терапия ВРФ способствовала сохранению функции клеток-продуцентов IFN- γ экспрессировать соответствующий ген. Наблюдалось повышение уровня экспрессии противовоспалительных цитокинов *Il10* и *Il1rn* в группах, где животные получали ВРФ, K14 и K18. Фуллерен C60 также был способен позитивно влиять на уровень экспрессии гена *Adora2a*, стимулируя его экспрессию, несмотря на понижение под действием LPS. При расчете

соотношений *Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b* наиболее благоприятный прогноз течения заболевания был выявлен у животных, получавших K17 и K18, что коррелировало с данными выживаемости.

Результаты исследования продемонстрировали выраженную противовоспалительную активность фуллерена C60 и его комплексов в модели эндотоксического шока. В ходе эксперимента было установлено, что соединения K14 и K17 эффективно подавляли экспрессию гена *Tnfa* в легких, почках и печени, тогда как ВРФ и K18 значительно снижали уровень экспрессии *Il1b* во всех исследуемых органах. Была выявлена способность ВРФ и K18 восстанавливать функциональную активность IFN- γ -продуцирующих клеток. Была продемонстрирована стимуляция экспрессии противовоспалительных цитокинов - как *Il10*, так и *Il1rn* демонстрировали значительное повышение уровня экспрессии под действием указанных соединений во всех исследованных тканях. Важным аспектом исследования стало выявление влияния фуллерена C60 и комплекса K18 на экспрессию гена *Adora2a*, проявляющегося в предотвращении его патологического подавления.

Анализ соотношений противовоспалительных и провоспалительных маркеров (*Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b*) в легких, почках и печени достоверно подтвердил связь между применением соединений K17 и K18 и высокой выживаемостью подопытных животных. Суммируя полученные данные по летальности и динамике экспрессии цитокиновых генов, можно заключить, что именно комплексы K17 и K18 обладают наиболее выраженной противовоспалительной активностью среди всех исследованных соединений, что проявляется как на молекулярном, так и на системном уровне.

3.8 Изучение ранозаживляющей активности комбинированных соединений на модели раневого воспалительного процесса *in vivo*

3.8.1 Визуальная оценка процесса заживления раневого поражения

На первом этапе изучения ранозаживляющей активности комбинированных соединений на основе катионных пептидов и фуллерена C60 было проведено

исследование способности пептидов влиять на ранозаживляющую активность фуллерена C60 в составе конъюгатов и комплексов. С этой целью была воспроизведена модель хирургической раны на мышцах линии BALB/с. На примере соединений ASM-45 и ASM-46 (конъюгаты фуллерена C60 и пептидов КК-46 и ST-10, соответственно) оценивали возможность влияния пептидов на активность фуллерена C60 в составе конъюгата. Для оценки прямого воздействия пептидов на раневое микроокружение и последующего сравнения с их конъюгированными формами были сформированы экспериментальные группы животных, получавших мазевые препараты на основе водных растворов пептидов КК-46 и ST-10. Во время эксперимента проводилась ежедневная визуальная оценка состояния раны и процесса заживления индивидуально для каждого животного. На рисунке 81 представлены фотографии мышей с поврежденным кожным покровом после терапии.

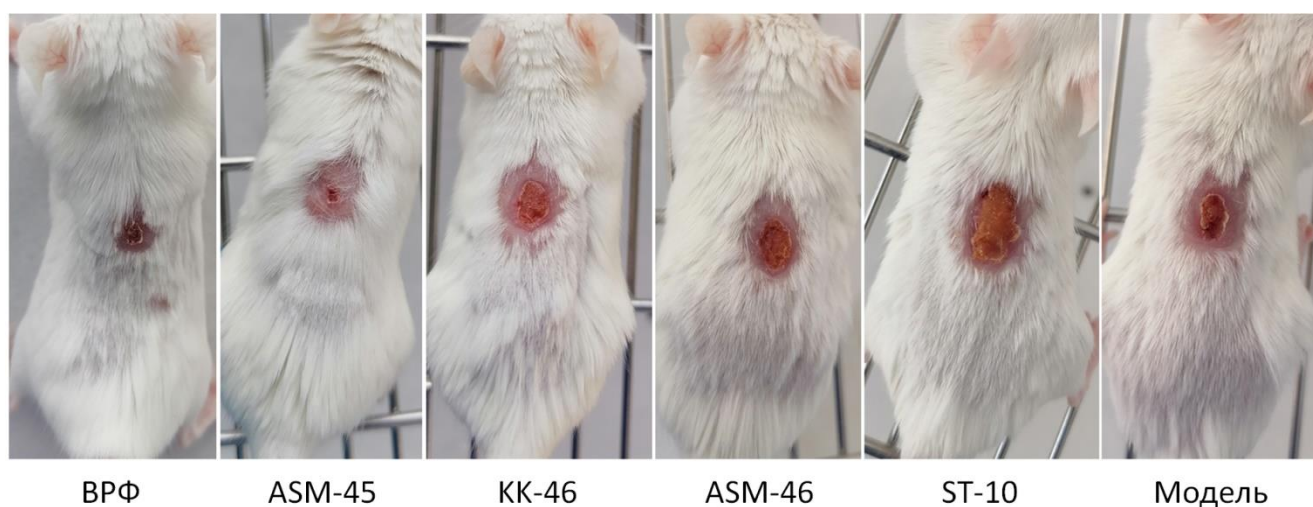


Рисунок 81 – Фото мышей на 12-й день после терапии раневого поражения. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «ASM-45» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса ASM-45; «КК-46» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида КК-46; «ASM-46» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса ASM-46; «ST-10» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида ST-10; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

С целью оценки ранозаживляющей эффективности исследуемых соединений проводили измерение площади раневой поверхности (в мм) на 1 и 12 дни эксперимента. Площадь исходного поражения кожи спины мышей составляла $133,1 \pm 32,8 \text{ мм}^2$. В последний день эксперимента площадь раневого поражения составляла: у мышей группы «ВРФ» – $7,1 \pm 6,5 \text{ мм}^2$, «ASM-45» – $5,3 \pm 10,1 \text{ мм}^2$, «КК-46» – $19,6 \pm 9,6 \text{ мм}^2$, «ASM-46» – $18,1 \pm 8,9 \text{ мм}^2$, «ST-10» – $35,9 \pm 15,7 \text{ мм}^2$, «Модель» – $22,2 \pm 8,1 \text{ мм}^2$. Для наглядности, результаты измерений были выражены в процентах и представлены на рисунке 82.

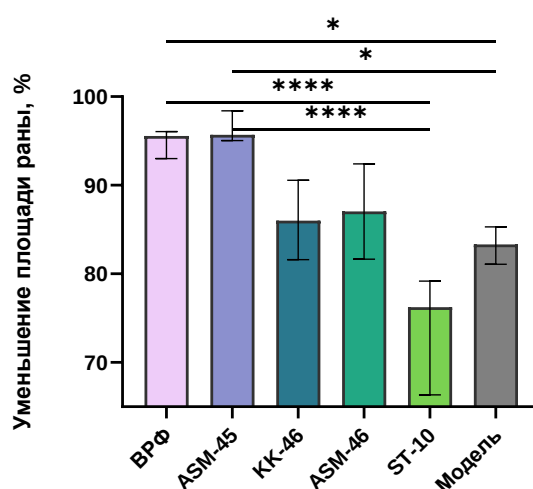


Рисунок 82 – Ранозаживляющая эффективность препаратов на 12-й день после моделирования раневого поражения кожи *in vivo* (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; **** - $p < 0,0001$. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «ASM-45» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса ASM-45; «КК-46» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида КК-46; «ASM-46» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса ASM-46; «ST-10» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида ST-10; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

На графике видно, что процент остаточного раневого поражения по группам составил: «ВРФ» – 5,3 %, «ASM-45» – 4,0 %, «КК-46» – 14,7 %, «ASM-46» – 13,6 %, «ST-10» – 27,0 %, «Модель» – 16,7 %. На графике видно, что остаточное поражение кожи было наименьшим в группах «ВРФ» и «ASM-45». Степень заживления после терапии ран мазью на основе ВРФ и комплекса ASM-45

(группы «ВРФ» и «ASM-45») была статистически значимо выше относительно группы отрицательного контроля (группа «Модель») на 11,4 % и 12,7 %, соответственно. Ранозаживляющая эффективность при обработке ран мазью на основе пептида КК-46, входящего в состав конъюгата ASM-45, была на уровне группы отрицательного контроля (группа «Модель»), что указывает на отсутствие самостоятельной регенеративной активности у пептида КК-46.

В результате лечения мазью, содержащей пептид ST-10, наблюдали замедление регенерации кожи, что может быть связано со специфическими свойствами данного пептида. Показано, что применение конъюгата на основе пептида ST-10, ASM-46, не приводило к ускорению процесса заживления, что, вероятно, свидетельствует о негативном влиянии ST-10 на ранозаживляющую активность фуллерена C60. Показано, что степень заживления кожи мышей группы «ASM-45» была достоверно выше, чем в группе «ST-10».

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод, что степень ранозаживляющей активности фуллерена C60 меняется в зависимости от катионного пептида, который находится с ним в составе конъюгата. Так, например, фуллерен C60 сохранял свою ранозаживляющую активность в составе конъюгата ASM-45 и не проявлял ее в составе конъюгата ASM-46, что, вероятно, может быть связано со структурными различиями пептидов КК-46 и ST-10, соответственно.

На следующем этапе работы было проведено изучение ранозаживляющей активности нековалентных комплексов на основе фуллерена C60 и катионных пептидов. На рисунке 83 представлены фотографии животных после терапии исследуемыми препаратами.

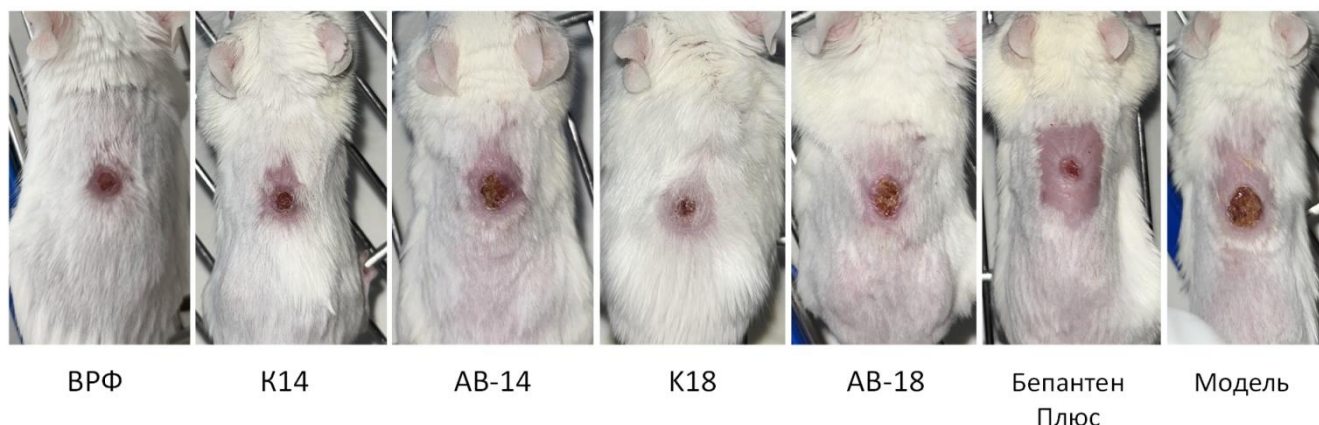


Рисунок 83 – Фото мышей на 11-й день после терапии раневого поражения. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «K14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса K14; «АВ-14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-14; «K18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса K18; «АВ-18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-18; «Бепантен Плюс» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазь Бепантен Плюс; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

При изучении ранозаживляющей активности комплексов K14 и K18 (комплексы фуллерена C60 и пептидов АВ-14 и АВ-18, соответственно) исходное поражение кожи у животных составляло $109,8 \pm 25,2 \text{ мм}^2$. На 11-й день после терапии площадь раневого поражения составляла: у мышей группы «ВРФ» – $9,8 \pm 6,3 \text{ мм}^2$, «K14» – $9,2 \pm 5,9 \text{ мм}^2$, «АВ-14» – $13,0 \pm 5,9 \text{ мм}^2$, «K18» – $6,9 \pm 4,3 \text{ мм}^2$, «АВ-18» – $14,1 \pm 3,1 \text{ мм}^2$, «Бепантен Плюс» – $8,2 \pm 4,4 \text{ мм}^2$, «Модель» – $20,1 \pm 9,7 \text{ мм}^2$. Результаты измерений также были выражены в процентах и представлены на рисунке 84.

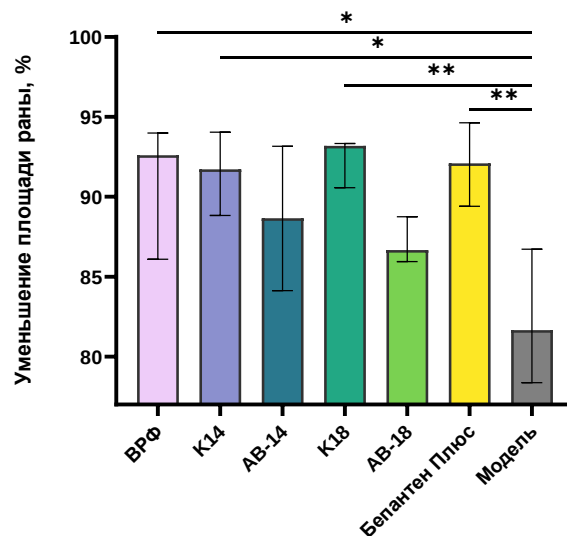


Рисунок 84 – Ранозаживляющая эффективность препаратов на 11-й день после моделирования раневого поражения кожи *in vivo* (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «К14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса К14; «АВ-14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-14; «К18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса К18; «АВ-18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-18; «Бепантен Плюс» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазь Бепантен Плюс; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

Процент остаточного раневого поражения по группам в среднем составил: «ВРФ» – 9,0 %, «К14» – 8,4 %, «АВ-14» – 11,8 %, «К18» – 7,8 %, «АВ-18» – 12,8 %, «Бепантен Плюс» – 8,1 %, «Модель» – 18,3 %. Применение мази на основе ВРФ, К14 и К18 выявило существенное преимущество в заживлении ран относительно животных, не получавших терапию («Модель»), сопоставимое с препаратом «Бепантен Плюс». При обработке ран мазевой композицией на основе комплексов К14, К18 и ВРФ разницы в степени заживления кожных поражений выявлено не было, что указывает на сохранение ранозаживляющей активности фуллерена C60 в составе данных комплексов.

Таким образом, в результате визуальной оценки процесса заживления ран было показано наличие ранозаживляющей активности у комплексов К14 и К18.

Для детального анализа ранозаживляющей активности исследуемых препаратов был проведен анализ экспрессии генов факторов, участвующих в процессе регенерации кожи.

3.8.2 Оценка уровня экспрессии генов патогенетически значимых факторов регенеративного процесса

В ходе изучения способности исследуемых препаратов влиять на процесс заживления ран, было проведено моделирование раневого поражения кожи *in vivo*. Оценку уровня экспрессии генов проводили на образцах кожи, отобранной после эвтаназии животных на 11-й день эксперимента, путем количественного определения мРНК. Была проанализирована экспрессия следующих генов, участвующих в процессах регенерации и ангиогенеза: *Hmgb1*, *Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*, *Il10*, *Tgfb1*, *Hif1a*, *Flg*, *Adora2a*, *Vegfa*, *Fgf2*, *Egf*, *Foxp3*.

На первом этапе исследования проводился анализ экспрессии генов цитокинов, вовлеченных в процесс заживления ран. Одним из основных таких цитокинов является алармин HMGB1, который активно секретируется и высвобождается при повреждении тканей. На рисунке 85А представлена экспрессия его гена (*Hmgb1*).

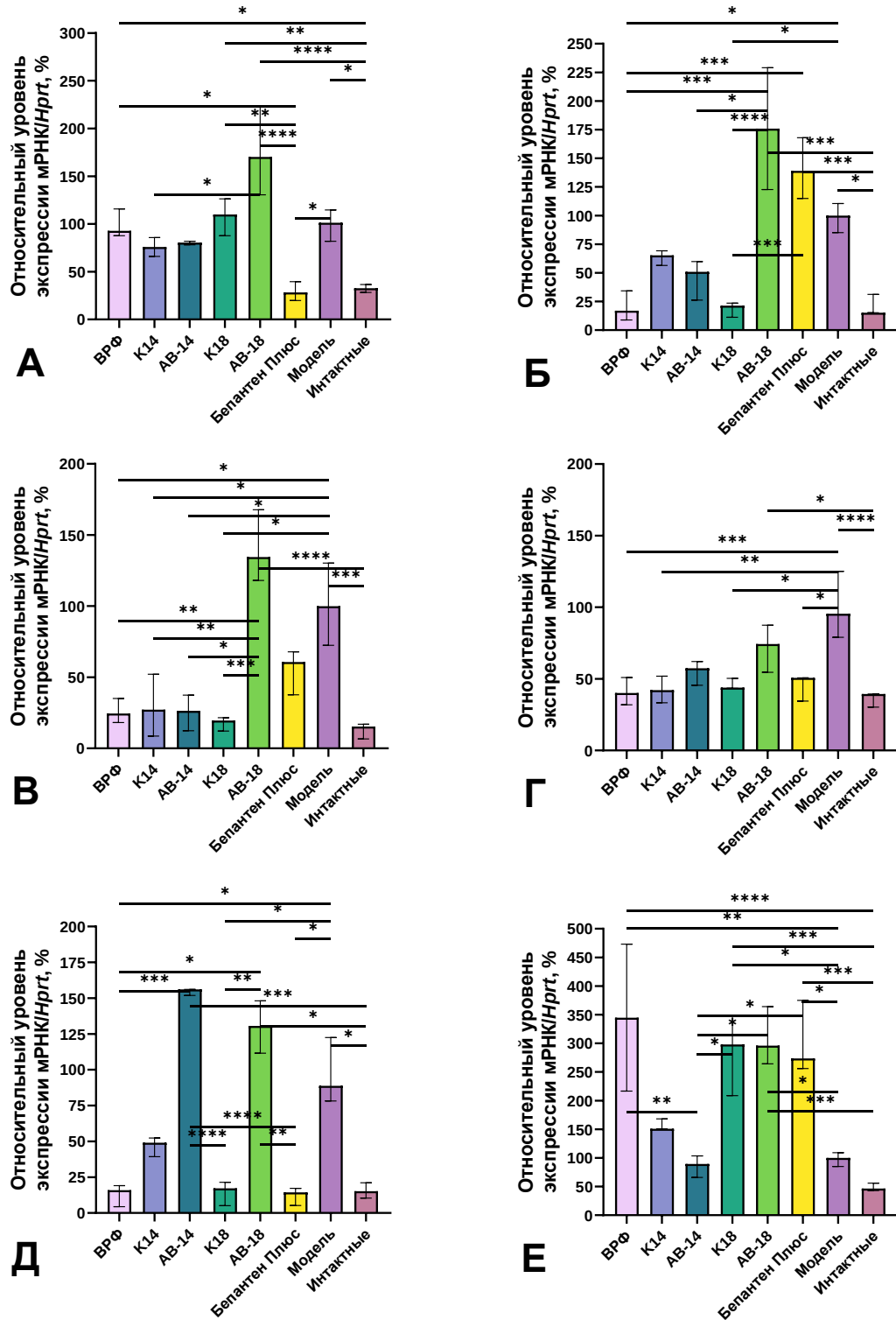


Рисунок 85 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Hmgb1* (А), *Il1a* (Б), *Il1b* (В), *Tnfa* (Г), *Il6* (Д) и *Il10* (Е) в коже мышей на 11-й день после моделирования раневого поражения *in vivo* (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$).

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «К14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую

композицию на основе комплекса K14; «AB-14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида AB-14; «K18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса K18; «AB-18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида AB-18; «Бепантен Плюс» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазь Бепантен Плюс; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

Видно, что в группах «ВРФ», «K18», «AB-18» и «Модель» уровень экспрессии *Hmgb1* был достоверно повышен по сравнению с группой «Интakтные», что говорит об избыточной выработке данного белка при раневом поражении. Было показано, что между группами мышей «K14» и «AB-14» и мышами, не получавшими терапию (группа «Модель») достоверных различий выявлено не было, однако уровень экспрессии в этих группах был выше, чем у интактных животных. Важно отметить, что применение препарата «Бепантен Плюс» приводило к понижению экспрессии *Hmgb1*.

Известно, что внеклеточная форма белка HMGB1 проявляет цитокиновую активность, инициируя каскад воспалительных реакций и секрецию цитокинов и хемокинов, влияет на дифференцировку клеток эпидермиса, а также способствует заживлению ран. Данный белок нарушает синтез коллагена, тем самым снижая риск образования рубцовой ткани на месте раневого поражения [303]. По полученным данным можно предположить, что фуллерен C60, катионные пептиды AB-14, AB-18 и комплексы на их основе, возможно, интенсифицируют процесс регенерации ткани путем стимуляции экспрессии гена *Hmgb1*, снижая при этом риск образования рубца.

Далее было важно оценить влияние исследуемых соединений на уровень экспрессии генов *Il1a* и *Il1b*, кодирующих одноименные провоспалительные цитокины. Сравнительный анализ мРНК гена *Il1a* в коже мышей представлен на рисунке 85Б. Видно, что на 11-й день после моделирования раневого поражения у животных в группе «Модель» наблюдалось достоверное повышение уровня экспрессии гена *Il1a* по сравнению с группой «Интakтные». Показано, что при

нанесении на рану мази на основе ВРФ или K18 уровень экспрессии данного гена понижался в 5 раз относительно модельной группы. У животных, получавших K14 и АВ-14, уровень экспрессии *Il1a* был понижен на 35 % и 50 %, соответственно, по сравнению с группой «Модель».

Результаты экспрессии *Il1b* после раневого поражения представлены на рисунке 85В. На графике показано, что уровень экспрессии данного гена в группе «Модель» был достоверно выше, чем в группе «Интактные». У животных, получавших фуллерен C60, комплексы K14 и K18, а также катионный пептид АВ-14, уровень экспрессии *Il1b* снижался до уровня интактной группы, что говорит о противовоспалительном действии данных соединений.

Уровни экспрессии *Il1a* и *Il1b* у животных, получавших комплекс K14 и пептид, входящий в его состав, АВ-14, были сопоставимы между собой. Это позволяет предположить, что пептид АВ-14 сам по себе способен подавлять экспрессию *Il1a* и *Il1b*. Терапия пептидом АВ-18 не вызывала подавление экспрессии данных генов, в то время у мышей, получавших его комплекс с фуллереном C60 (K18), наблюдалось снижение экспрессии *Il1a* и *Il1b*. Полученные данные позволяют сделать вывод, что фуллерен C60 способствовал снижению уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 α и IL-1 β и сохранял показанную противовоспалительную активность в составе комплексов с катионными пептидами, K14 и K18.

Другими генами, участвующими в индукции воспаления при раневом процессе, являются *Tnfa* и *Il6*. Результаты способности изучаемых соединений влиять на экспрессию *Tnfa* представлены на рисунке 85Г.

Было показано, что в группах животных, получавших терапию ВРФ и комплексами на его основе («ВРФ», «K14», «K18»), уровень экспрессии *Tnfa* был достоверно снижен примерно на 60 % по сравнению с животными, не получавшими терапию (группа «Модель»), в то время как в группе «Бепантен Плюс» уровень экспрессии был снижен на 50 %. У животных, получавших

катионные пептиды АВ-14 и АВ-18, была выявлена лишь тенденция к снижению экспрессии *Tnfa*.

По данным литературы чрезмерно высокий уровень экспрессии *Tnfa* может привести к хронизации воспалительного процесса и чрезмерному разрастанию рубцовой ткани, препятствуя процессу заживления ран [302], в связи с чем подавление экспрессии данного гена оказывает терапевтический эффект. По полученным данным можно сделать вывод, что фуллерен С60 и комплексы К14 и К18 способствуют подавлению воспаления в очаге поражения.

Относительно экспрессии *Il6*, представленной на рисунке 85Д, можно отметить, что в группах «ВРФ», «К18» и «Бепантен Плюс» наблюдалось достоверное снижение экспрессии данного гена до уровня группы «Интakтные». После терапии мазью на основе «К14, «АВ-14» и «АВ-18» достоверной разницы в экспрессии *Il6* относительно модельной группы выявлено не было, однако у мышей, получавших К14, наблюдалось снижение экспрессии данного гена.

Известно, что повышенная продукция IL-6 в месте раневого поражения стимулирует синтез коллагена, способствуя избыточному разрастанию фиброзной соединительной ткани [28]. Поэтому на основе полученных данных можно сделать вывод, что ВРФ и К18 способствуют фенотипу заживления раневого поражения без рубцов.

На рисунке 85Е показано влияние исследуемых нами соединений на экспрессию *Il10* в коже мышей на 11-й день после моделирования раневого поражения.

Было показано, что уровень экспрессии мРНК *Il10* в группах «ВРФ», «К14», «К18», «АВ-18» и «Бепантен Плюс» повышался на 245 %, 51 %, 198 %, 196 % и 174 %, соответственно, относительно такового модельной группы.

Известно, что повышенная экспрессия *Il10* в дермальных ранах у взрослых особей обеспечивает заживление тканей без образования рубцов [249]. Результаты исследования согласуются с данными литературы о способности фуллерена С60 снижать риск рубцевания при регенерации ран [245]. Опираясь на полученные

результаты, показывающие способность исследуемых соединений стимулировать экспрессию гена *Il10*, можно сделать заключение о том, что фуллерен C60 сохраняет эту способность в составе комплекса K18.

На следующем этапе работ был проведен анализ экспрессии генов факторов, оказывающих прямое влияние на процесс восстановления тканей. Сравнительный анализ мРНК гена *Tgfb1* в коже мышей после моделирования раневого поражения представлен на рисунке 86А.

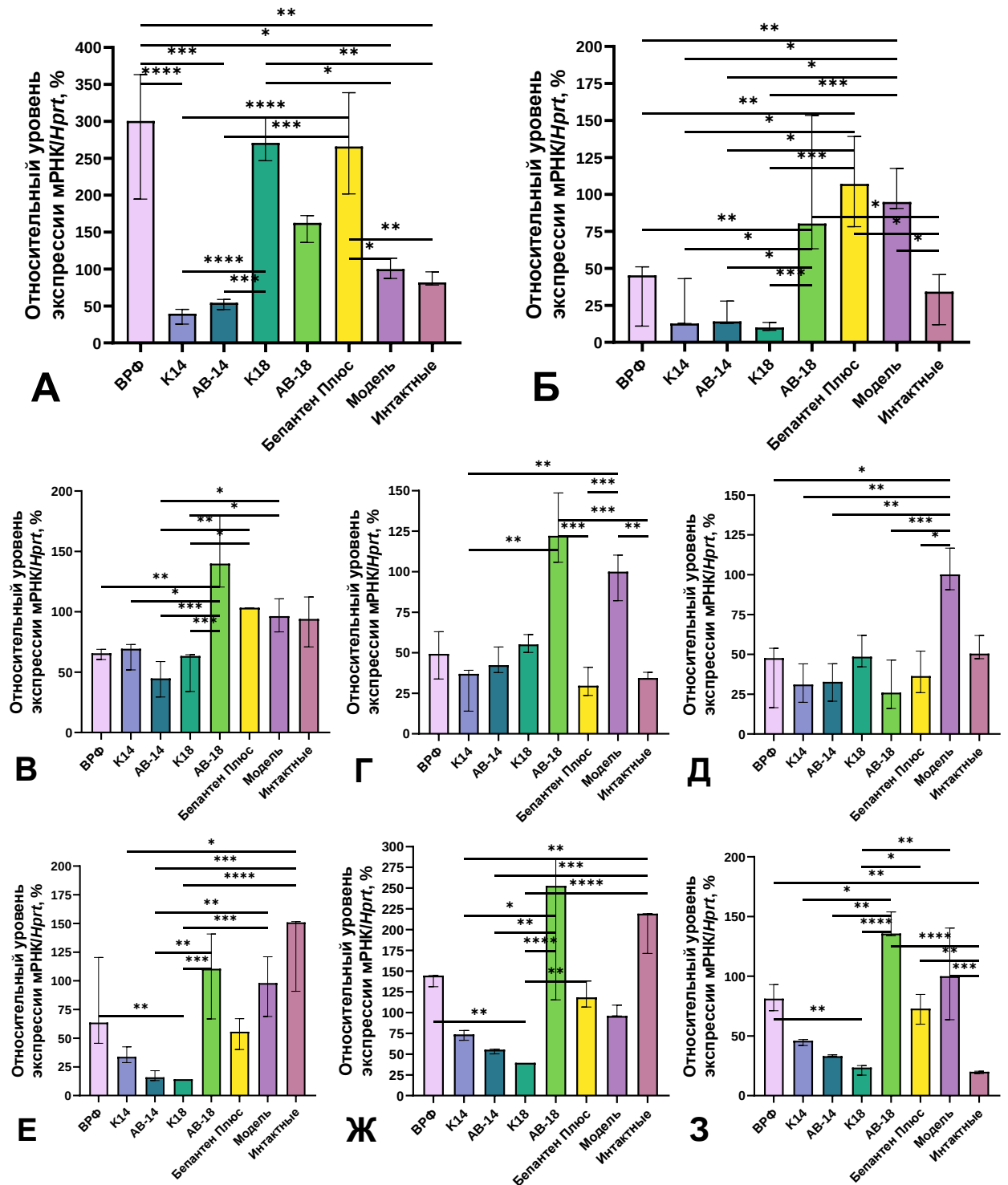


Рисунок 86 – Относительный уровень экспрессии мРНК *Tgfb1* (А), *Hif1a* (Б), *Flg* (В), *Adora2a* (Г), *Vegfa* (Д), *Fgfb* (Е), *Egf* (Ж) и *Foxp3* (З) в коже мышей на 11-й день после моделирования раневого поражения *in vivo* (медиана $\pm$ интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$. «ВРФ» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе ВРФ; «K14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса K14;

«АВ-14» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-14; «К18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе комплекса К18; «АВ-18» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе пептида АВ-18; «Бепантен Плюс» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазь Бепантен Плюс; «Модель» - на поверхность ран животных ежедневно наносили мазевую композицию на основе PBS

Видно, что после применения мазевой композиции на основе фуллерена C60 и К18 и препарата «Бепантен Плюс» наблюдалось достоверное повышение экспрессии *Tgfb1* на 201 %, 171 % и 166 %, соответственно, относительно группы «Модель». Показано, что достоверной разницы в экспрессии данного гена у мышей, получавших К14 и АВ-14, и мышей группы «Модель» не наблюдалось.

Полученные результаты соответствуют более раннему предположению, что фуллерен C60 способствует эпителизации кожного покрова [245]. Фуллерен C60 сохранял эту способность в составе комплекса К18, в то время как катионный пептид АВ-14, вероятно, препятствовал указанному эффекту в составе комплекса К14, подавляя экспрессию *Tgfb1*.

В продолжение исследований был проведен анализ экспрессии гена *Hif1a* (рисунок 86Б). На графике показано снижение уровня экспрессии *Hif1a* в группах «ВРФ», «К14», «АВ-14» и «К18» на 55 %, 88 %, 86 % и 90 %, соответственно, по сравнению с группой «Модель».

Снижение уровня экспрессии данного гена у мышей, получавших терапию ВРФ, К14, АВ-14 и К18, вероятно, можно объяснить восстановлением баланса кислорода вследствие восстановления сосудистой сети в микроокружении кожи на 11-й день эксперимента после терапии вышеупомянутыми соединениями. Известно, что, при нормальном содержании кислорода в тканях, HIF-1α быстро и непрерывно деградирует после трансляции. HIF-1α обнаруживается в тканях раны в течение 5 дней после повреждения, что соответствует времени, когда при заживлении ран регистрируется наиболее низкая концентрация кислорода [23,

192]. Через 5 дней после повреждения кожи уровень кислорода в микроокружении раны начинает восстанавливаться.

Наряду с *Hif1a*, нами была проанализирована экспрессия гена *Flg* (рисунок 86В). Видно, что достоверной разницы между группами «Модель» и «Интактные» выявлено не было. Однако было показано снижение уровня экспрессии *Flg* в группах «ВРФ», «K14», «АВ-14» и «K18» на 35 %, 30 %, 55 % и 37 %, соответственно, относительно модельной группы.

Ген *Flg* кодирует структурный белок филаггрин, который играет основополагающую роль в развитии и поддержании кожного барьера. Известно, что эпидермальная делеция *Hif1a* приводит к снижению экспрессии *Flg* [289]. На основе полученных данных можно предположить, что в условиях гипоксии уровень экспрессии гена филаггрина не меняется после моделирования раневого поражения. Однако снижение уровня экспрессии *Hif1a* после терапии исследуемыми соединениями способствует снижению экспрессии *Flg* и является, вероятно, временным явлением, характерным для данного этапа ранозаживления.

На рисунке 86Г представлена экспрессия гена рецептора аденозина A2a (*Adora2a*). После моделирования раневого поражения в группах «Модель» и «АВ-18» было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии данного гена на 66 % и 88%, соответственно, относительно группы «Интактные». Видно, что разницы между группами «ВРФ», «АВ-14», «K18» и группой «Модель» после раневого поражения кожи выявлено не было. На графике видно, что в группах «K14» и «Бепантен Плюс» наблюдалось достоверное снижение экспрессии данного гена до уровня интактной группы.

Согласно данным литературы, экспрессия гена *Adora2a* повышается в условиях гипоксии [163]. Как и в случае HIF-1 α , активация рецептора аденозина A2a, продукция которого увеличивается после раневого поражения, стимулирует экспрессию генов многих ферментов гликолиза и способствует ангиогенезу. Полученные результаты коррелируют с данными экспрессии *Hif1a* и, вероятно, могут быть объяснены снижением потребности в гликолизе у клеток кожи

мышей, получавших ВРФ, K14, АВ-14 и K18. Можно сделать предположение, что в микроокружении ран животных соответствующих групп кровеносные сосуды и, как следствие, кислородный баланс были восстановлены в большей степени, чем в группах «АВ-18» и «Модель».

На следующем этапе исследования был проведен анализ экспрессии генов факторов ангиогенеза. Уровень экспрессии гена одного из данных факторов, VEGF-A, представлен на рисунке 86Д. Видно, что на 11-й день после моделирования раневого поражения у мышей, получавших исследуемые соединения, наблюдалось достоверное снижение экспрессии *Vegfa* до уровня группы «Интактные». Уровень экспрессии данного гена в группах «ВРФ», «K14», «АВ-14», «K18», «АВ-18» и «Бепантен Плюс» был снижен на 52 %, 69 %, 67 %, 52 %, 74 % и 64 %, соответственно, относительно модельной группы.

Считается, что в пораженном участке кожи VEGF-A регулирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что опосредованный VEGF процесс ангиогенеза был ускорен и находился на этапе завершения на 11-й день эксперимента после терапии исследуемыми препаратами.

Нами была проанализирована экспрессия другого ангиогенного фактора, FGF-b (рисунок 86Е). На графике показано достоверное снижение уровня экспрессии соответствующего гена (*Fgfb*) у мышей, получавших K14, АВ-14 и K18, на 66 %, 84 % и 86 %, соответственно, относительно мышей интактной группы. Достоверной разницы в экспрессии *Fgfb* в группах «ВРФ», «АВ-18», «Бепантен Плюс» и «Модель» по сравнению с группой «Интактные» выявлено не было, однако наиболее явное снижение экспрессии данного гена наблюдалась у мышей, получавших «ВРФ» и «Бепантен Плюс».

Известно, что повышение уровня экспрессии *Fgfb* происходит непосредственно после повреждения кожи и на 12-14 дни после ранения [36] и в условиях гипоксии требует активности HIF-1 α [57]. На 11-й день после

повреждения ткани или индукции воспаления экспрессия *Fgfb* обычно снижается до базального уровня и ниже.

Уровень экспрессии гена ангиогенного фактора EGF (*Egf*) приведен на рисунке 86Ж. Показано, что при нанесении фуллерена C60, K14, АВ-14 и K18 на раны животных наблюдалось снижение экспрессии данного гена на 74 %, 145%, 164 % и 179 %, соответственно, относительно группы «Интактные». На рисунке видно, что достоверной разницы между группами «Модель» и «Интактные» выявлено не было.

Известно, что EGF играет ключевую роль в заживлении ран и поддержании гомеостаза тканей, регулируя выживаемость, пролиферацию, миграцию и дифференциацию клеток. EGF также защищает фибробласты от окислительного стресса, способствуя элиминации токсичных продуктов окисления во время острой фазы заживления ран. Пик экспрессии *Egf* наблюдается в 1-й день после ранения, после чего происходит снижение экспрессии данного гена [32, 241]. Поскольку забор образцов кожи был осуществлен на 11-й день эксперимента, на этапе реэпителизации, вероятно, экспрессия *Egf* уже не была выражена.

После раневого поражения рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) экспрессируют на своей поверхности регуляторные Т-лимфоциты (Tregs). Поэтому далее мы оценивали уровень экспрессии гена *Foxp3*, кодирующего одноименный белок-регулятор развития и функционирования Tregs (рисунок 86З). Уровень экспрессии *Foxp3*, как показано на графике, снижался в группах «ВРФ», «K14» и «АВ-14» на 19 %, 54 % и 67 %, соответственно, в сравнении с группой «Модель». Было показано достоверное снижение экспрессии данного гена у мышей, получавших K18, на 76 % относительно модельной группы. При этом уровень экспрессии данного гена в группе «Модель» был выше уровня интактной группы на 80 %, что говорит о специфическом для раневого воспаления присутствии FOXP3⁺ Tregs в микроокружении кожи.

При полнослойном ранении субпопуляция высокоактивированных Tregs накапливается в коже мышей. В частности, через 7 дней после травмы (после

разрешения воспалительной фазы и начала пролиферативной стадии) количество Tregs в месте раны достигает пика, с уровнем в 20 раз выше, чем исходный [165]. Количество Treg снижается после воспалительной фазы, то есть между 5 и 14 днями, после чего не оказывает заметного влияния на кинетику заживления ран.

Полученные результаты позволяют предположить, что фуллерен C60 и комплексы на его основе, особенно K18, способствовали ускорению процесса ранозаживления и подавлению воспаления в коже, что индуцировало уменьшение количества FOXP3⁺ Tregs в микроокружении раны.

По совокупности представленных данных можно сделать вывод, что фуллерен C60 и комплексы на его основе подавляли экспрессию провоспалительных цитокинов. Терапия ВРФ и комплексами стимулировала экспрессию гена *Hmgb1*, тем самым снижая риск образования рубцовой ткани на месте повреждения кожи. Было выяснено, что фуллерен C60 и комплексы K14 и K18 подавляли экспрессию генов провоспалительных цитокинов *Il1a*, *Il1b* и *Tnfa*. Использование ВРФ и K18 достоверно снижало экспрессию *Il6*, а терапия ВРФ и K18, но не K14, стимулировала экспрессию *Il10* и *Tgfb1* в коже, способствуя эпителизации и заживлению ран без рубцов. Выявлено, что терапия мазью на основе фуллерена C60 и комплексов K14 и K18 приводила к снижению уровня экспрессии *Hif1a* на 11-й день после поражения кожи, вследствие чего наблюдалось снижение уровней экспрессии генов факторов ангиогенеза *Vegfa*, *Fgfb* и *Egf*. Полученные результаты исследования позволяют выдвинуть предположение, что терапия ВРФ, K14 и K18, вероятно, интенсифицирует ангиогенез и восстановление кислородного баланса в микроокружении раны, в результате чего происходит снижение экспрессии гена *Hif1a*. В пользу вывода о купированном воспалении в коже животных групп ВРФ, K14 и K18 также говорит пониженная экспрессия гена *Foxp3*, кодирующего маркер регуляторных Т-лимфоцитов.

Таким образом, было показано, что фуллерен C60 сохранял свою ранозаживляющую активность в составе комплексов с катионными пептидами

AB-14 и AB-18. Наиболее перспективным соединением для терапии раневого поражения является, на наш взгляд, комплекс K18 на основе ВРФ и катионного пептида AB-18.

В результате проведенных исследований были получены комбинированные соединения на основе фуллерена C60 и катионных антибактериальных пептидов, которые обладают противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью, что было показано на моделях *in vivo* эндотоксического шока (противовоспалительная активность), на модели *in vivo* раневого поражения кожи (ранозаживляющая активность) и *in vitro* при оценке бактерицидной активности в отношении ряда бактериальных культур (антибактериальная активность), в том числе полирезистентных штаммов. Наиболее перспективными соединениями, на наш взгляд, являются K17 и, обладающий более высокой бактерицидной активностью, K18. Указанные комплексные соединения могут стать основой для создания препаратов для терапии раневых поражений и воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Способность комбинированных соединений влиять на выживаемость животных и экспрессию генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при моделировании состояния эндотоксического шока

Эндотоксин, также называемый липополисахаридом, является мощным стимулятором каскада воспалительных реакций, которые могут прогрессировать до сепсиса и септического шока. Термин эндотоксический септический шок используется в отношении пациентов с высоким содержанием эндотоксина в организме и органной недостаточностью.

Модели *in vivo*, в частности, с использованием лабораторных мышей, остаются эффективным инструментом для изучения патофизиологического ответа на инфекции и разработки стратегий лечения сепсиса и эндотоксического шока как одного из наиболее опасных его осложнений [149]. Модели на лабораторных мышах можно разделить на три группы, опосредованные: (1) введением токсина, (2) введением живых патогенов и (3) разрушением эндогенного барьера после перевязки слепой кишки и пункции. Релевантность данных моделей все еще обсуждается рядом авторов [104, 151, 252]. Среди различных моделей состояния эндотоксического шока *in vivo* на мышах особого внимания заслуживает моделирование посредством прямой инъекции эндотоксинов, таких как LPS, в кровь, брюшину или легкие, поскольку вызывает сильную воспалительную реакцию, имитирующую ответ врожденной иммунной системы человека [210]. Преимущество этого метода заключается в технической простоте и воспроизводимом ответе иммунной системы при инъекции контролируемого количества токсина.

LPS (эндотоксин) является основным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, составляя примерно 75 % поверхности внешнего листка ее внешней мембраны. Он высвобождается в кровоток при разрушении бактерий (смерть, лизис клеток), инфицирующих кровь или ткани. Он также может

проникать посредством транслокации из желудочно-кишечного тракта, когда барьерная функция нарушена из-за гипоперфузии, воспаления, нарушения регуляции комменсальной микрофлоры или сепсиса любого генеза [107]. Эндотоксин является гликолипидом: он состоит из гидрофобной липидной части, называемой липидом А, которая закреплена во внешнем листке, и гидрофильной полисахаридной части, которая простирается за пределы клетки. Полисахаридная часть представляет собой основной олигосахаридный домен и О-антиген. Антиген О (также называемый О-цепью) представляет собой полисахарид, который состоит из нескольких олигосахаридных единиц и связан с липидом А через область ядра. Липид А заслуживает особого внимания, поскольку эта часть молекулы эндотоксина ощущается хозяином и отвечает за активацию иммунной системы [41].

Как правило, при моделировании состояния эндотоксического шока на мышах, LPS вводят животным внутрибрюшинно, и в нескольких исследованиях сообщалось о сходстве между этой моделью и человеческим сепсисом [93]. Тем не менее, сходство транскрипционных ответов человека и мышей широко обсуждается [211]. Так, Rosier с соавторами исследовали пул транскриптов мышей на модели эндотоксического шока и сравнили его с профилями экспрессии генов человека [227]. Для исследования авторы использовали клетки, извлеченные из брюшной полости мышей после инъекции LPS, и было показано, что транскрипционный ответ мышей отражает как реакцию клеток крови человека на бактерии, так и степень смертности пациентов с сепсисом.

Напротив, Seok и соавторы сообщили, что транскрипционный ответ на острый воспалительный стресс у людей плохо воспроизводится на моделях *in vivo* [239]. В то же время, Такао с соавторами обнаружили высокосignимую корреляцию между транскрипционным ответом у людей и у мышей [259].

Модели сепсиса или состояния эндотоксического шока на мышах также имеют свои ограничения из-за очевидных различий между видами и типом вводимых патогенов или эндотоксинов. Использование различных линий мышей,

а также возраст и пол животных, также могут повлиять на кинетику и интенсивность иммунного ответа [253]. Кроме того, молекулярные массы эндотоксинов, полученных из различных штаммов грам-отрицательных бактерий, могут различаться в 100 раз, что делает количественные измерения сложными. Количество LPS, используемое для воспроизведения системных признаков эндотоксического шока на мышах, широко варьируется в зависимости от происхождения эндотоксина и линии мышей, но среднее значение дозы обычно составляет 10 мг/кг [195]. Наконец, показана гетерогенность среди пациентов с сепсисом и эндотоксическим шоком в отношении степени, в которой эндотоксин вызывает патологическое состояние [64, 156], что также характерно и для лабораторных животных.

После введения LPS у мышей быстро развиваются системные клинические признаки, включая снижение двигательной активности, летаргию, дрожь и пилоэрекцию, которые быстро прогрессируют. В целом, дозы LPS, используемые в моделях сепсиса, приводят к гипотермии, вероятно, из-за быстрого прогрессирования болезненного состояния и большого соотношения площади поверхности к объему в случае мелких животных, и потере веса. В дополнение к этим физическим признакам инъекция высокой дозы LPS быстро вызывает снижение сердечного выброса и повышение периферического сосудистого сопротивления [134, 266], а также снижение общего количества лейкоцитов с одновременным снижением количества лимфоцитов и нейтрофилов в крови [152].

В рамках данной работы для оценки противовоспалительной активности тестируемых препаратов использовали модель LPS-индуцированного эндотоксического шока у мышей. При моделировании состояния эндотоксического шока *in vivo* падение веса животных было выбрано в качестве одного из основных оцениваемых критериев релевантности модели. Введение LPS (*V. cholerae*, тип Inaba 569B) мышам всех экспериментальных групп вызывало потерю веса более 15 % от общей массы тела и через 72 часа после введения LPS было выявлено достоверное отличие показателя веса животных

группы «Модель» от такового животных, не получавших инъекцию эндотоксина (рисунки 57, 58). При этом введение животным исследуемых препаратов, а именно ВРФ и комплексов на его основе, через 30 минут после инъекции LPS способствовало более быстрому восстановлению веса животных до приближенных к исходному значений в сравнении с группой «Модель». Так, вес животных групп «K14» и «K18» статистически значимо не отличался от такового животных интактной группы через 72 часа после введения LPS.

При моделировании состояния летального эндотоксического шока с использованием LPS из *E. coli* K-235 и предварительным введением исследуемых препаратов за 24 часа и за 1 час до инъекции LPS также наблюдали потерю веса животными в течение первых 48 часов (рисунок 59). Животные группы «K17» теряли вес в меньшей степени (11,9 % от исходной массы тела) относительно животных других опытных и модельной групп, например, группы «K14» (16,3 %), и впоследствии быстрее восстанавливали вес. Так, в последний день эксперимента (через 120 часов после введения LPS) потеря массы тела у животных, получавших K17, ВРФ, K14, K18 и Дексаметазон составила 7,9, 13,5, 13,3, 13,0 и 14,9%, соответственно (относительно группы «Модель»).

Другим оцениваемым критерием тяжести смоделированной патологии стал процент гибели животных при моделировании летального эндотоксического шока. С этой целью мышам всех экспериментальных групп («Модель», «ВРФ», «K14», «K17», «K18» и «Дексаметазон») был введен LPS из *E. coli* K-235. Гибель 100 % животных (группа «Модель») регистрировали в течение первых суток после инъекции. Показано, что профилактическое введение исследуемых соединений способствовало выживаемости животных групп «ВРФ» (87,5 % выживаемости), «K14» (75 % выживаемости), «K17», «K18» и «Дексаметазон», причем в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» на момент завершения эксперимента все животные остались живы. Препарат Дексаметазон, который был выбран в качестве положительного контроля, препятствовал гибели мышей, что соответствует данным литературы [199]. Важно отметить, что в группах «K17» и

«K18» наблюдалась 100 % выживаемость животных, то есть результат лучший в сравнении с группами «ВРФ» и «K14». Это позволяет сделать предположение о наличии у пептидов АВ-17 и АВ-18, входящих в состав комплексов K17 и K18, соответственно, собственной иммуномодулирующей или иной биологической активности, приводящей к синергизму с противовоспалительной активностью ВРФ.

С точки зрения воздействия на иммунный ответ, инъекция высокой дозы LPS вызывает очень быстрое, но временное повышение системных уровней цитокинов [44]. Liu с соавторами описывают, что после воздействия LPS уровни цитокинов в крови и органах достигают пика в течение 1–6 часов и снижаются до базальных уровней в течение 12–24 часов, что позволяет предположить, что реакции цитокинов происходят на ранних стадиях сепсиса [161]. Поэтому при выборе времени забора патологического материала мышей с LPS-индуцированным шоком мы ориентировались на данные литературы, а именно исследование Niu и соавторов, в рамках которого органы были отобраны через 1 час после введения LPS с целью измерения уровней TNF- α и IL-6 в соответствующих тканях [199].

Rosier с соавторами исследовали транскрипционный ответ мышей, которым вводили LPS, и сравнивали его с таковым клеток человека, стимулированных *in vitro* LPS, либо с таковым клеток крови пациентов с сепсисом [227]. Авторы идентифицировали множество дифференциально экспрессируемых генов, относящихся TNF-, IL-17-, Chemokine-, NF-kappa B-, Toll-like рецептор-, NOD-, MAPK-, JAK-STAT-сигнальным путям в стимулированных LPS перитонеальных клетках мыши. Следует отметить, повышение уровней экспрессии *Tnfa* и *Il10* наблюдалось в клетках через 1 час после стимуляции LPS, но отсутствовало через 40 часов.

Известно, что легкие и печень являются двумя основными органами, которые в значительной степени поражаются во время развития и прогрессирования сепсиса и эндотоксического шока. На ранних стадиях сепсиса

уровни провоспалительных цитокинов быстро увеличиваются в легких и печени. Salkowski с соавторами исследовали изменения экспрессии мРНК генов цитокинов IL-6, TNF- α , G-CSF, IL-1 α и IL-10 в легких и IL-1 β , IL-6, IFN- γ , G-CSF, iNOS и IL-10 в печени мышей с сепсисом, вызванным перевязкой слепой кишки и пункцией, и обнаружили, что пункция индуцировала экспрессию генов этих цитокинов у мышей, что предполагает повышение регуляции белков цитокинов при раннем эндотоксическом шоке на транскрипционном уровне [232].

По данным литературы, в почках регистрируют более низкие уровни TNF- α и IL-1 β по сравнению с печенью и легкими, но более высокий уровень IL-6. Было показано, что уровни циркулирующего IL-6 тесно связаны с дисфункцией левого желудочка сердца и тяжестью повреждения почек и могут говорить о серьезных последующих осложнениях, в частности гибели [125]. По мнению Liu и соавторов, повышенные уровни IL-6 могут способствовать дисфункции сердца и почек во время эндотоксического шока [161].

В рамках данной работы мы оценивали уровень экспрессии генов основных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе ранних этапов развития эндотоксического шока (через 1 час после инъекции эндотоксина), вызванного введением летальной дозы LPS. В качестве патологического материала были взяты легкие, печень и почки мышей как органы, подверженные наибольшему поражению при развитии эндотоксического шока по данным литературы.

Эндотоксический шок, потенциально смертельный клинический синдром, опосредован действием регуляторов раннего иммунного ответа, таких как TNF- α , IL-1 (в частности, IL-1 α и IL-1 β), IL-6, IFN- γ , и медиатора позднего иммунного ответа - амфотерина (HMGB1) [308], высвобождающегося через 8 ч после воздействия LPS. Развитие состояния эндотоксического шока в модели *in vivo*, воспроизведенной в данной работе, сопровождалось массивной экспрессией мРНК провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в тканях органов, взятых для дальнейшего анализа, а именно легких, почках и печени. Для

исследования были выбраны цитокины, относящиеся к ранним медиаторам воспалительного ответа, поэтому забор биологического материала осуществляли через час после внутрибрюшинного введения эндотоксина. Влияние исследуемых соединений на поздние медиаторы воспалительного ответа, включая триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках (TREM-1) и белок высокомолекулярной группы бокс 1 (HMGB1) будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Фактор некроза опухоли альфа характеризуется ранним и определяющим участием в высвобождении других цитокинов при развитии системной воспалительной реакции. TNF- α вырабатывается не только активированными иммунными клетками (макрофагами), но и неиммунными клетками (фибробластами) в ответ на инвазивные, инфекционные или воспалительные стимулы [139]. В литературе описано, что высвобождение TNF- α макрофагами происходит в течение 30 минут после инициирующего события, после транскрипции гена и трансляции РНК, что указывает на то, что этот цитокин является ранним регулятором иммунного ответа. TNF- α действует через специфические трансмембранные рецепторы, рецептор TNF (TNFR)1 и TNFR2 [235], что приводит к активации иммунных клеток и высвобождению ряда каскада иммунорегуляторных факторов.

Известно, что повышение мРНК TNF- α в легких предшествует повышению данного фактора в печени, что согласуется с общим наблюдением первичного поражения легких в дебюте синдрома множественной органной недостаточности [278].

Известно, что TNF- α не является единственным цитокином, ответственным за развитие полиорганной недостаточности [43]. Так, описано исследование, когда у мышей с нокаутом TNF- α -лимфотоксина- α (TNF/LT-/-) все равно развивался данный синдром. Предполагается, что это связано со вторым основным фактором септического шока, цитокинами семейства IL-1. Аналогично TNF- α , IL-1 высвобождается в первую очередь из активированных макрофагов, но

связывается с рецепторами IL-1 типа I (IL-1R1) и II (IL-1R2), оказывая сопоставимые с TNF- α нижестоящие эффекты на иммунные клетки [137]. TNF- α и IL-1 действуют синергически, вызывая состояние, подобное шоку, для которого характерны резкое увеличение сосудистой проницаемости, тяжелый отек легких и кровотечения [97]. Введение бактериального эндотоксина приводит к образованию и высвобождению TNF- α и IL-1 в системный кровоток, где их пиковые концентрации обнаруживаются через 60–90 мин после введения LPS [179].

IL-6 вырабатывается широким спектром клеток, особенно макрофагами, дендритными клетками, лимфоцитами, эндотелиальными клетками, фибробластами и гладкомышечными клетками в ответ на стимуляцию LPS, IL-1 и TNF- α [207]. Повышенные концентрации IL-6 регистрируются при многих острых состояниях, таких как ожоги, серьезные хирургические вмешательства и сепсис, и достигают пиковых концентраций позднее, чем TNF- α и IL-1 [150]. Уровни IL-6 в плазме стабильно повышены при этих состояниях и коррелируют со многими показателями тяжести заболевания, такими как возникновение полиорганной недостаточности и общая смертность [277]. IL-6 обладает множеством биологических эффектов, включая активацию В- и Т-лимфоцитов и системы коагуляции, а также модуляцию гемопоэза [275]. В отличие от TNF- α и IL-1, сама по себе инъекция IL-6 не вызывает состояния, подобного сепсису [215]. Ключевой функцией IL-6 является индукция лихорадки и посредничество в ответе острой фазы [24], системной реакции на воспалительный стимул, которая характеризуется лихорадкой, лейкоцитозом и высвобождением белков острой фазы печени, таких как С-реактивный белок, компоненты комплемента, фибриноген и ферритин [117]. Исследования *in vivo* на мышах с нокаутом гена IL-6 продемонстрировали, что удаление гена IL-6 защищает от смертности и развития органной недостаточности при остром воспалении брюшины, вызванном зимозаном [84].

IFN- γ в основном продуцируется активированными NK-клетками, Th1- и цитотоксическими Т-клетками CD8⁺ [136]. Его продукция регулируется цитокинами, продуцируемыми макрофагами, в частности, TNF- α .

Описано, как сепсис влияет на функцию миелоидных клеток мышей [78]. Моноциты мышей демонстрировали сниженную экспрессию генов МНС класса II и провоспалительных цитокинов [187], вследствие чего изменялись количество и функция дендритных клеток [290], а количество супрессорных клеток миелоидного происхождения увеличивалось [94]. Было высказано предположение, что причиной является нарушение продукции IFN- γ лимфоидными клетками [144], поскольку развитие сепсиса негативно влияет на CD8⁺ Т-лимфоциты. Описано уменьшение количества наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти при развитии сепсиса [80, 85, 182], а также расстройство функций оставшихся клеток, что проявлялось повышенной экспрессией маркеров истощения и сниженной способностью элиминировать вирусы и опухолевые клетки [79, 80, 86]. Данные нарушения, вероятно, были связаны со сниженной продукцией IFN- γ CD8⁺ Т-лимфоцитами [79, 86].

Противовоспалительный цитокин IL-10 представляет собой гомодимерный цитокин, вырабатываемый многими типами иммунных клеток, такими как Мо, Мф, В- и Т-лимфоциты и NK-клетки [181]. Функциональные исследования широко выявили противовоспалительные функции IL-10. Известно, что IL-10 подавляет выработку таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-1, IL-5, IL-8, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α и MIP-2 α в моноцитах, макрофагах, нейтрофилах и NK-клетках [190]. IL-10 стимулирует выработку IL-1Ra и sTNFRs, тем самым нейтрализуя провоспалительные действия IL-1 и TNF [235]. Так, введение рекомбинантного белка IL-10 защищало мышей от летальной эндотоксемии, даже когда IL-10 вводили через 30 минут после введения LPS [127].

Естественным ингибитором IL-1 β является антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA), введение которого, как сообщается, обеспечивает протективный эффект при моделировании сепсиса *in vivo* [27]. Было показано, что уровень

циркулирующего в крови IL-1RA повышен у пациентов с сепсисом, а мутации в гене этого цитокина, *Il1rn*, приводят к системному воспалительному заболеванию [110].

При моделировании эндотоксического шока важно оценивать изменение экспрессии генов, участвующих в активации противовоспалительных путей. С этой целью мы оценивали уровень экспрессии гена *Adora2a*, кодирующего аденозиновый рецептор A2a (A2aAR). Аденозиновый рецептор A2a присутствует на клетках, участвующих в воспалении, включая нейтрофилы, тучные клетки, моноциты, макрофаги, эозинофилы, тромбоциты и Т-клетки, и участвует в противовоспалительных реакциях [185]. Агонисты A2aAR снижают продукцию супероксида нейтрофилами, дегрануляцию нейтрофилов, продукцию TNF- α моноцитами и макрофагами и адгезию нейтрофилов к эндотелиальным клеткам [254], поэтому являются потенциально полезными терапевтическими средствами, предположительно пригодными для терапии септического шока.

Сепсис-ассоциированное воспаление возникает вследствие критической дисрегуляции иммунных сетей. При эндотоксин-индуцированном шоке избыточная продукция цитокинов вызывает полиорганное повреждение, после чего рекрутированные иммунные клетки усиливают цитокиновый каскад, формируя персистирующее воспаление. В частности, известно, что бактериальные компоненты, особенно LPS, активируют макрофаги, индуцируя выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1, IL-6, которые затем инициируют каскад реакций, способствующих развитию системного воспаления. Избыточная продукция провоспалительных цитокинов приводит к повреждению эндотелия и повышению проницаемости микрососудов, агрегации тромбоцитов, дисфункции миокарда и ишемии, что, в свою очередь, приводит к инвалидности или смерти. Таким образом, неконтролируемая воспалительная реакция, вызванная провоспалительными цитокинами, продуцируемыми макрофагами, является основным механизмом при развитии сепсиса и его осложнений.

Ранние исследования показали, что при моделировании атопического дерматита *in vivo* водный раствор фуллерена C60 и его производные были способны подавлять выработку IL-4 и IL-5 и стимулировать продукцию IL-12 и IFN- γ , что способствовало существенному уменьшению проявлений аллергического воспаления [243]. Противовоспалительные свойства фуллерена C60 также продемонстрированы при моделировании шоковых состояний: при анафилактическом шоке его применение повышало выживаемость животных на 60% [244]. На модели хирургической раны кожи *in vivo* терапия на основе ВРФ приводила к подавлению экспрессии генов цитокинов *Tnfa*, *Il6* и *Il1a* [245]. По-видимому, ВРФ может влиять на элементы врожденной иммунной системы, в частности макрофаги, и способствовать снижению чрезмерных воспалительных реакций [8].

В данном исследовании было показано, что экспрессия *Tnfa*, *Il1b* и *Il6* была повышена при моделировании эндотоксического шока, вызванного LPS. Для изучения противовоспалительной активности фуллерена C60 и его комплексов с катионными антибактериальными пептидами, данные вещества были введены мышам BALB/c до инъекции LPS. Результаты показали, что терапия ВРФ и комплексами на его основе в разной степени способствовала понижению уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6, в органах мышей с экспериментальным эндотоксическим шоком. Результаты исследования позволяют предположить вовлечение NF- κ B-зависимого механизма в модулирующее действие фуллерена C60 на синтез цитокинов, однако для полного понимания молекулярных механизмов данного процесса требуются дополнительные исследования.

Эндотоксический шок, вызванный избыточной активацией иммунной системы в ответ на бактериальный липополисахарид (эндотоксин), сопровождается дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Соотношение уровней экспрессии генов и продукции IL-10, обладающего противовоспалительной активностью, и TNF- α , ключевого

провоспалительного медиатора, часто рассматривается как потенциальный биомаркер исхода при критических состояниях. Однако при оценке через 1 час после индукции эндотоксина это соотношение, вероятно, не демонстрирует достаточной прогностической ценности в отношении летальности. Через 1 час после введения эндотоксина цитокиновый каскад находится в начальной фазе: уровень TNF- α достигает максимальных значений в первые 1–2 часа, тогда как повышение концентрации IL-10 происходит с некоторой временной задержкой. Проведение измерений на ранних сроках развития воспаления дает важную информацию о начальных стадиях иммунного ответа, тогда как диагностически значимый баланс *Il10/Tnfa*, позволяющий получить более полную картину регуляции воспаления, формируется в течение 3–6 часов.

Напротив, соотношение уровня экспрессии *Il1rn* к уровню экспрессии *Il1b* уже через 1 час после введения LPS может служить ранним прогностическим маркером. Это связано с биологической ролью и кинетикой данных цитокинов при развитии воспалительного иммунного ответа.

IL-1 β вырабатывается в первые минуты после активации Toll-подобных рецепторов (TLR4) липополисахаридом, и пик концентрации данного цитокина в крови наблюдается уже через 1–2 часа после индукции воспаления. Избыток IL-1 β индуцирует компенсаторный синтез IL-1RA, который начинается одновременно или даже раньше. Уровень экспрессии *Il1rn* и продукции IL-1RA также достигает максимума в течение 1–2 часов. Следовательно, соотношение *Il1rn/Il1b* уже через 1 час после введения LPS отражает развитие ранних компенсаторных механизмов при моделировании системного воспаления. Высокое соотношение *Il1rn/Il1b* коррелирует со сниженной вероятностью развития чрезмерного иммунного ответа и системных полиорганных нарушений.

На модели состояния эндотоксического шока *in vivo* было показано, что терапия на основе фуллерена C60 и его комплексов сопровождалась восстановлением баланса экспрессии генов цитокинов *Il1rn/Il1b*, что коррелировало с данными выживаемости. Важно отметить, что выживаемость

групп, получавших комплексы K17 и K18, была выше, чем в группе, получавшей фуллерен C60 без пептида ("ВРФ"). Следовательно, фуллерен C60 и катионные пептиды АВ-17 и АВ-18 демонстрировали синергичное действие в составе комбинированных соединений K17 и K18, соответственно, при подавлении системного воспалительного ответа.

Было показано раннее снижение экспрессии IFN- γ в течение первого часа после введения LPS, что может быть обусловлено прямым повреждением клеток-продуцентов (прежде всего NK-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов), а также дисрегуляцией сигнальных путей. Терапия фуллереном C60 и комплексами на его основе позитивно влияла на экспрессию *Ifng*, то есть способствовала восстановлению функции CD8⁺ Т-лимфоцитов экспрессировать данный ген при развитии эндотоксического шока. Введение ВРФ и K18 способствовало восстановлению и последующему увеличению экспрессии *Adora2a*. Длительная репрессия указанного рецептора может приводить к хронизации воспалительных процессов, что наблюдается при сепсисе, ожирении и аутоиммунных заболеваниях. Терапевтическое восстановление аденозиновых сигнальных путей рассматривается как перспективная стратегия для лечения таких состояний.

Таким образом, нами была разработана модель LPS-индуцированного шока у мышей, в которой были воспроизведены основные проявления данного патологического состояния, а именно потеря веса, летальность и существенное повышение уровня экспрессии генов основных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что фуллерен C60 сохранял противовоспалительную активность в составе комплексов K14, K17 и K18. Предварительная инъекционная терапия водным раствором фуллерена C60 и растворами комплексов на основе КП и фуллерена C60 обеспечивала защиту от LPS-индуцированного эндотоксического шока у мышей.

4.2 Влияние комбинированных соединений на экспрессию генов патогенетически значимых факторов регенеративного процесса на модели раневого воспалительного процесса *in vivo*

Классические методы лечения раневых поражений кожи направлены, в основном, на модуляцию факторов макросреды (например, влажности и давления), в то время как в настоящее время представляется актуальным создание ранозаживляющих лекарственных средств, нацеленных на факторы микроокружения (например, клетки, белки, пептиды). В том числе, одним из перспективных направлений исследований представляется разработка препаратов для стимуляции безрубцового заживления ран.

Ранее было показано, что водный раствор фуллерена C60 обладает ранозаживляющей и противовоспалительной активностью, вследствие чего представляет собой перспективное средство для лечения острых и хронических ран [245]. Для того чтобы выяснить, способны ли катионные пептиды оказывать негативное действие на биологическую активность фуллерена C60, был проведен анализ ранозаживляющей способности фуллерена C60 в составе конъюгатов ASM-45 и ASM-46. Для данного эксперимента была воспроизведена модель хирургической полнокожной раны *in vivo*.

В ходе эксперимента было показано, что конъюгат на основе фуллерена C60 и катионного пептида КК-46 (ASM-45) ускорял процесс ранозаживления на уровне ВРФ. Процент остаточного раневого поражения животных, получавших ВРФ и ASM-45, был статистически значимо меньше такового группы «Модель». Эффективность ранозаживления в группе «КК-46» соответствовала таковой модельной группы, следовательно, пептид КК-46 не обладал ранозаживляющей активностью.

Что касается комплекса ASM-46, то было выявлено отсутствие ранозаживляющей активности у данного соединения. Было показано, что терапия пептидом ST-10, входящим в состав ASM-46, приводила к замедлению процесса

ранозаживления у мышей. Таким образом, пептид ST-10 подавлял ранозаживляющую активность фуллерена C60 в составе конъюгата.

Полученные результаты, вероятно, объясняются структурными особенностями пептида ST-10. Пептид ST-10 характеризуется сильными основными свойствами. Помимо способности взаимодействовать с активными центрами ферментов за счет большого заряда, данный пептид представляет собой сильный нуклеофил. Соединения, содержащие электрофильные группы, способны ковалентно связываться с нуклеофильными фрагментами пептидов и белков и образовывать токсичные аддукты. Хотя механизмы данного процесса изучены не полностью, считается, что указанная токсичность носит индивидуальный характер. Последующая протеолитическая обработка белков, модифицированных нуклеофилами, может привести к образованию конструкций, которые распознаются как чужеродные и, следовательно, вызывают либо толерантность, либо инициацию активного иммунного ответа *in vivo*. Соединения с нуклеофильными группами могут быть ответственны за появление артефактной активности при проведении эксперимента.

К нуклеофильным группам можно отнести тиоловый (Cys), аминные (Lys, His, Arg) и гидроксильные фрагменты (Ser, Tyr). Катионный пептид ST-10 имеет разветвленную структуру, и на каждом из двух С-концов расположено по два остатка лизина. Таким образом, данный пептид имел одновременно 4 нуклеофильных группы, что делало его сильным нуклеофилом и могло повлиять на способность взаимодействовать с активными центрами белков в микроокружении раны кожи и препятствовать процессу ранозаживления.

Было показано, что биологическая активность фуллерена C60 зависит от катионного пептида, входящего в состав конъюгата. В связи с этим, мы приняли решение изменить подход к созданию комбинированных соединений, чтобы уменьшить негативное влияние катионных пептидов на фуллерен C60. Для этого мы сосредоточились на создании нековалентных комплексов, образованных за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий.

Поскольку эффективность конъюгатов ASM-45 и ASM-40 не превышала ранозаживляющую активность свободного фуллерена C₆₀, мы также продолжили поиск новых катионных пептидов, потенциально способных проявлять большую активность. Наибольшей антибактериальной активностью обладали катионные пептиды АВ-14 и АВ-18, на основе которых были получены нековалентные комплексы K14 и K18.

На следующем этапе работы была проведена оценка ранозаживляющей активности комплексов K14 и K18, ввиду наиболее выраженной бактерицидной активности данных исследуемых соединений в сравнении с другими. В ходе визуальной оценки было выявлено, что в группах, где животные получали накожно ВРФ или комплексы K14 и K18, процесс заживления ран шел интенсивнее относительно контрольной группы («PBS»). Было показано, что пептиды АВ-14 и АВ-18 не обладали собственной ранозаживляющей активностью и не влияли на ранозаживляющую активность фуллерена C₆₀ в составе комплексов K14 и K18. Полученные результаты согласуются с литературными данными, описывающими наличие у фуллерена C₆₀ и его водной дисперсии регенеративной активности [245].

Также, мы оценивали уровень экспрессии мРНК генов цитокинов и других факторов, участвующих в процессе ранозаживления. Было продемонстрировано повышение уровня экспрессии гена *Hmgb1* после терапии ВРФ и K18. Кодированный данным геном, белок HMGB1 представляет собой молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями (DAMP). Известно, что внеклеточная форма HMGB1 действует как цитокин, вызывая провоспалительные реакции в эндотелиальных клетках, увеличивая экспрессию молекул сосудистой адгезии, а также секрецию цитокинов (например, TNF- α) и хемокинов. Согласно данным литературы, высокий уровень экспрессии гена *Hmgb1* облегчает заживление ран и дифференциацию эпидермиса через сигнальные пути TLR4 и Wnt/Notch [305], а снижение уровня экспрессии гена *Hmgb1* в фибробластах приводит к увеличению синтеза коллагена и повышению прочности раны на

разрыв. Таким образом, повышение уровня экспрессии *Hmgb1* у мышей, получавших ВРФ и К18, свидетельствовало о наличии у данных соединений способности стимулировать заживление раны без образования рубца.

Оценка экспрессии генов других провоспалительных цитокинов, участвующих в развитии раневого воспаления, показала, что нанесение на область поражения ВРФ и комплексов К14 и К18 достоверно снижало уровень экспрессии генов *Il1b* и *Tnfa*, а терапия ВРФ и К18 приводила к снижению уровня экспрессии *Il1a* и *Il6* до уровня интактной группы.

Известно, что IL-1, TNF- α и IL-6 являются основными провоспалительными цитокинами, активируемыми после травмы и участвующими в заживлении ран [135]. Описано, что при первоначальной воспалительной реакции наблюдается высокий уровень экспрессии *Il6*, который снижается до 8 дня после повреждения кожи. Максимум экспрессии *Tnfa* наблюдается на 7-й [112] или 10-й [23] день после ранения, в то время как второй пик повышения экспрессии гена *Il1a* регистрируется через 6 дней после инфицирования раны [25]. Предполагается, что увеличение экспрессии генов цитокинов семейства IL-1 необходимо для предотвращения [169].

При развитии острой воспалительной реакции TNF- α и IL-1 β участвуют в активации фибробластов, эндотелиоцитов и лейкоцитов [116], а IL-6 оказывает пролиферативное действие на кератиноциты [37] и играет роль в регуляции и синтезе С-реактивного белка [208]. Несмотря на то, что умеренное воспаление в первые дни после ранения способствует заживлению ран, чрезмерное повышение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов может привести к хронизации воспаления и чрезмерному образованию рубцовой ткани, препятствуя процессу регенерации. Полученные нами результаты позволяют сделать вывод, что применение фуллерена C60 и комплексов К14 и К18 эффективно подавляло раневое воспаление.

В то время как повышенные уровни экспрессия генов провоспалительных цитокинов стимулируют аномальное избыточное разрастание соединительной

ткани, повышение экспрессии генов противовоспалительных цитокинов предотвращает фиброз [249]. Одним из таких противовоспалительных цитокинов является IL-10. После восстановления сети кровеносных сосудов и, как следствие, нормального уровня кислорода в микроокружении раны, IL-10 опосредует переход метаболизма макрофагов с гликолиза на окислительное фосфорилирование [99], а также способствует поляризации макрофагов в тип M2 [109]. IL-10 подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, и предотвращает синтез коллагена, тем самым препятствуя образованию рубцовой ткани [286].

В данной работе мы наблюдали существенное повышение экспрессии гена *Il10* после терапии раневого поражения мазью на основе ВРФ и K18, что говорит о способности данных соединений препятствовать разрастанию рубцовой ткани.

Помимо цитокинов, гипоксия представляет собой основной стрессовый фактор, влияющий на микроокружение поврежденной кожи, а также способствующий заживлению ран. Типичной реакцией генома клеток на гипоксические воздействия является увеличение экспрессии гена HIF-1 α (*Hif1a*) [298]. Нами было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии *Hif1a* у мышей, получавших ВРФ, K14 и K18, относительно модельной группы, что говорит о способности фуллерена C60 влиять на экспрессию данного гена.

Ткани организма, как правило, адаптируются к условиям острой, легкой или умеренной гипоксии, в то время как в условиях хронической тяжелой гипоксии не выживают. Из-за повреждения сосудистой сети, окружающей рану, что приводит к нарушению доставки кислорода, во время начального этапа воспалительного процесса участки раневого поражения часто гипоксичны. Уменьшение концентрации кислорода в микроокружении раны активирует сигнальные пути, направленные на восстановление подачи кислорода к клеткам и модулирование функций клеток в условиях гипоксии [192]. Острая гипоксия вызывает временное увеличение клеточной репликации и способствует инициированию процесса заживления.

Этот адаптивный ответ во многом опосредован HIF-1, считающимся главным регулятором гомеостаза кислорода и действующим преимущественно в гипоксических условиях. Субъединица HIF-1 β экспрессируется конститутивно, тогда как экспрессия субъединицы HIF-1 α зависит от уровня кислорода в тканях [237]. При физиологическом уровне кислорода в тканях, HIF-1 α быстро и непрерывно деградирует после трансляции [261], однако гипоксия тканей вызывает устойчивое увеличение экспрессии *Hif1a*. HIF-1 также стимулирует экспрессию генов ферментов гликолиза, способствуя выживаемости клеток в условиях снижения уровня кислорода [206]. Было показано, что экспрессия HIF-1 α играет ключевую роль в дифференциации миелоидных клеток в моноциты и макрофаги [81]. Кроме того, описано, что увеличение экспрессии мРНК *Hif1a* при раневых поражениях также коррелирует с активацией процесса ангиогенеза и, кроме того, способствует более быстрому стягиванию раны [231]. Однако успешное заживление ран в конечном итоге требует восстановления нормоксических условий посредством восстановления локальной микроциркуляторной системы [266]. Максимум экспрессии данного гена регистрируют на 5-й день после ранения, когда наблюдается минимальный уровень кислорода в тканях раны. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что терапия ВРФ, K14 и K18 интенсифицировала ангиогенез и восстановление кислородного баланса в тканях раны, что приводило к снижению экспрессии гена *Hif1a*.

HIF-1 также стимулирует экспрессию многих других генов, которые усиливают процесс заживления ран, в том числе *Tgfb1*. Было продемонстрировано повышение уровня экспрессии данного гена у мышей, получавших ВРФ и K18, при моделировании раневого поражения кожи.

При заживлении ран, TGF-1 β способствует ускорению ангиогенеза, реэпителизации и регенерации соединительной ткани [116]. Было выявлено, что экспрессия соответствующего гена увеличивается при травме. В частности, фибробласты способны секретировать в 9 раз больше TGF- β 1 в условиях

умеренной непродолжительной гипоксии [262]. Хроническое кислородное голодание значительно снижает активность фибробластов и секрецию ими TGF- β 1. Таким образом, полученные нами данные свидетельствовали о способности фуллерена C60 и комплекса K18 ускорять ангиогенез и реэпителизацию в коже мышей после моделирования раневого поражения.

Поскольку конечной целью реэпителизации является восстановление полноценного эпидермального барьера, мы оценили уровень экспрессии гена структурного белка кожи филагтрина (Flg) – критического белка, обеспечивающего целостность рогового слоя. Было показано снижение уровня экспрессии данного гена у животных, получавших K18.

Внешние слои клеток эпидермиса экспрессируют филаггрин, участвующий в агрегации кератиновых нитей для поддержания кожного барьера. Известно, что кератиноциты в условиях дефицита кислорода специфически стимулируют экспрессию данного гена в зависимости от концентрации HIF-1 α [289]. Вместе с тем, снижение экспрессии гена *Hif1a* индуцирует снижение уровня экспрессии *Flg*.

Трансляционная активация белка HIF-1 α также активирует экспрессию гена рецептора аденозина A2a (*Adora2a*). Согласно данным литературы, сигнальные пути рецептора аденозина обуславливают реакции клеток на гипоксию [163], а активация гена *Adora2a* стимулирует экспрессию генов гликолитических ферментов эндотелиальных клеток, что имеет решающее значение для патологического ангиогенеза. Гипоксия приводит к заметному увеличению продукции аденозина и активации аденозиновых рецепторов [71]. Иммунореактивность рецептора аденозина A2a наблюдается в ангиобластах в новообразованных кровеносных сосудах и значительно повышается при неоваскуляризации [166]. Было показано, что увеличение экспрессии *Adora2a* способствует ангиогенезу [184].

Полученные нами данные позволяют предположить, что терапия фуллереном C60 и комплексами K14 и K18 способствовала восстановлению

кислородного баланса в микроокружении раны, что приводило к снижению экспрессии *Adora2a*.

К целевым генам HIF также относится фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), представляющий собой сильный ангиогенный фактор. Также фибробласты, кератиноциты и макрофаги экспрессируют VEGF в ответ на IL-6.

В проведенных исследованиях мы показали существенное снижение уровня экспрессии гена *Vegfa* в группах, где животные получали фуллерен C60 и комплексы K14 и K18, что позволяет говорить о завершении процессов ангиогенеза у животных соответствующих групп.

Описано, что VEGF-A способствует ускорению ангиогенеза на ранних этапах заживления ран, в частности миграции эндотелиальных клеток [257] и их пролиферации [287], как показано в нескольких исследованиях *in vitro*.

Описано, что экспрессия мРНК *Fgf2*, или гена основного FGF, увеличивается при остром раневом поражении и играет роль в формировании грануляционной ткани, реэпителизации и ремоделировании ткани [213]. В то же время уровень экспрессии *Fgf2* снижается в хронических ранах [224]. Мы продемонстрировали, что, хотя фуллерен C60 не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Fgf2*, уровень экспрессии данного гена снижался после терапии K14 и K18 по сравнению с интактной группой.

В рамках данной работы мы также оценивали уровень экспрессии мРНК гена *Egf* в образцах кожи мышей через 11 дней после моделирования хирургической раны. Было показано достоверное снижение экспрессии данного гена у мышей, получавших K14 и K18, относительно интактной группы. Полученные результаты можно объяснить тем, что, согласно данным литературы, максимальная экспрессия мРНК *Egf* приходится на более ранние сроки раневого воспаления. Так, Chen X. с коллегами показали пик экспрессии данного гена на 5-й день после поражения кожи [76].

Другим важным белком является FOXP3, который регулирует развитие и функциональную активность регуляторных Т-клеток. Было выявлено снижение

уровня экспрессии соответствующего гена (*Foxp3*) после терапии комплексами на основе фуллерена C60. *Foxp3* представляет собой специфический маркер естественных и адаптивных регуляторных Т-клеток. Регуляторные Т-клетки, экспрессирующие *Foxp3*, контролируют воспаление в тканях. Известно, что высокоактивированные Treg накапливаются в коже вскоре после ранения, а специфическая абляция Treg замедляет реэпителизацию раны и кинетику ее закрытия. В области раны Treg препятствуют накоплению провоспалительных макрофагов, а также индуцируют экспрессию EGFR [219]. Полученные данные позволяют говорить о подавлении воспаления в области раны после терапии комплексами на основе фуллерена C60.

Таким образом, на финальной стадии заживления, когда рана почти полностью закрыта, наблюдаемый профиль цитокинов и факторов роста отражает процессы ремоделирования тканей и восстановления функциональной целостности кожи. Снижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов подтверждает переход от острой воспалительной фазы к ремоделированию, а также создание условий для синтеза внеклеточного матрикса. На этапе ремоделирования раны безрубцовое заживление оптимизировалось благодаря: прорегенеративной функции HMGB1, стимулирующего восстановление тканей и эпидермального барьера через RAGE-зависимую активацию фибробластов; синергического действия TGF- β и IL-10, где TGF- β подавлял избыточный синтез коллагена I типа, а IL-10 ингибировал остаточное воспаление, предотвращая фиброз. Параллельное снижение уровня экспрессии *Hif1 α* свидетельствовало о нормализации кислородного баланса в микроокружении раны и, следовательно, предотвращении процесса патологического ангиогенеза. О том же свидетельствует понижение экспрессии генов факторов ангиогенеза. Тем не менее, подавление *Hif1 α* косвенно угнетало экспрессию гена филагтрина (*Flg*) — ключевого белка терминальной дифференцировки кератиноцитов, поскольку *Hif1 α* модулирует EGF-зависимые пути, критичные для формирования эпидермального барьера. Однако на

финальной стадии заживления раны снижение экспрессии *Hif1a* становится физиологически оправданным, а экспрессия *Flg*, как ожидается, должна впоследствии восстановиться для формирования кожного барьера.

Таким образом, по совокупности полученных результатов можно сделать вывод, что фуллерен C60 и комплексы K14 и K18 подавляли воспаление в области раневого поражения и стимулировали регенеративные процессы, ускоряя восстановление сети кровеносных сосудов и кислородного баланса, в коже. Полученные данные свидетельствуют о том, что фуллерен C60 сохранял свою ранозаживляющую и противовоспалительную активность в составе комплексов K14 и K18, в большей степени в составе комплекса K18. Это делает данный комплекс наиболее перспективным для разработки новых лекарственных препаратов, направленных на терапию раневых поражений кожи.

4.3 Проектирование структуры катионных пептидов и их антибактериальная активность в отношении лабораторного штамма кишечной палочки

Для борьбы с проблемой устойчивости к антибиотикам во всем мире, необходимо разработать новое поколение противомикробных препаратов. Природные антимикробные пептиды демонстрируют множество трехмерных структур и могут использоваться в качестве шаблонов для разработки новых антибактериальных агентов. Несколько АМП в настоящий момент уже одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) [155], однако большинство из них существенно ограничены в возможности использования в качестве лекарственных средств на клинической практике.

Одной из многочисленных стратегий дизайна синтетических АМП является оптимизация природных последовательностей путем их усечения или замены отдельных фрагментов или аминокислот [42]. Так, например, для создания последовательностей некоторых исследуемых в данной работе пептидов были взяты фрагменты хорошо изученного кателицидина человека LL-37, который

обладает доказанной противомикробной активностью, однако имеет большую длину последовательности [12]. Его наиболее активный фрагмент был использован для конструирования коллекции синтетических пептидов, изученных в рамках данной работы на предмет антибактериальной активности.

Для конструирования других пептидов этой коллекции за основу был взят линейный α -спиральный пептид, описанный в литературе, – KKLRLKIAFK, который, в свою очередь, является модификацией последовательности MARNKPLGKKLRLAAAFK, выделенной из *P. aerophilum* [59]. Данный пептид отличался относительно короткой последовательностью и широким спектром описанной активности, наряду с невысокой токсичностью. Так, показана его активность против 15 штаммов таких патогенов, как *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. cloacae* и главное – против такого важного патогена, как *P. aeruginosa*.

Основой для еще ряда новых последовательностей стали пептиды из панели SAAP, обладающие более высокой, относительно LL-37, антимикробной активностью [89]. Так, например, пептид SAAP-148 проявлял активность относительно биопленок, которые являются огромнейшей проблемой стационаров и других медицинских учреждений. Важно отметить, что он был активен в физиологических условиях и эффективен относительно устойчивого к метициллину *S. aureus* и обладающего множественной лекарственной устойчивостью *A. baumannii*.

Пептиды AB-14, AB-17 и AB-18 были впервые получены в рамках данного исследования. В основе одного из наиболее активных пептидов AB-14 лежит мотив WKKI, встречающийся в последовательностях нативных пептидов членистоногих, активных в отношении *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*, таких как лазиоглоссины II и III (VNWKKILGKIIKVAK и VNWKKILGKIIKVVK, соответственно) [65] и мастопараны [269].

В основе двух других наиболее активных синтетических пептидов AB-17 и AB-18 лежит мотив LLK, который часто встречается в последовательностях

антибактериальных пептидов амфибий, таких как бомбинин H1 (IIGPVLGMVGSALGGLLKKI) [180] и темпорин В (LLPIVGNLLKSLL) [248], а также антибактериальных пептидов членистоногих, таких как понерицин L1 (LLKELWTKMKGAGKAVLGKIKGLL) [205] и оксиопинин 1 (FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ) [82]. Дупликация мотива LLK применяется в качестве молекулярной стратегии для усиления бактерицидного действия пептидов. Так, пептиды AB-17 и AB-18 содержали в своей последовательности 4 копии мотива LLK. Проведенный анализ базы данных APD3 также выявил наличие многочисленных синтетических пептидных последовательностей с дублированным вариантом этого мотива. В частности, синтетический пептид DeNo1014 содержал 5 повторений LLK [157].

В процессе дизайна катионных пептидов были использованы, в том числе, элементы чередования гидрофильных и гидрофобных аминокислот. Такие фрагменты в гидрофобной среде (липидные мембраны клеток), приобретают конформацию амфифильной спирали благодаря участию водородных связей, стимулируя транслокацию пептида через мембрану. Активность КАМП зависит от различий между структурами клеток млекопитающих и бактерий. Поскольку катионная природа антимикробных пептидов способствует электростатическому притяжению к отрицательно заряженным анионным фосфолипидам бактериальной мембраны, а их гидрофобность облегчает проникновение внутрь бактериальной клетки, последовательности КАМП выбираются с учетом наличия положительно заряженных аминокислот и гидрофобных аминокислот в последовательности [170]. Таким образом, пептидные последовательности для данного исследования были сконструированы на основании следующих правил: (1) содержание положительно заряженных аминокислот, (2) α -спиральная конформация и (3) содержание гидрофобных аминокислот.

Другой эффективный метод разработки пептидов заключается в разветвлении пептидных цепей с целью получения дендримерных пептидных конструкций, что приводит к повышению степени взаимодействия с мембраной

бактериальной клетки за счет кооперативных эффектов. Так, например, структуры пептидов АВ-17 и АВ-18 схожи по аминокислотному составу, однако введение разветвления по N-концу последовательности пептида АВ-18 (Arg-Arg) привело к повышению антибактериальной активности в 5 раз.

Катионный дендримерный пептид КК-46 был разработан для безопасной и эффективной доставки нуклеиновых кислот [143]. Его дизайн был основан на расчете молекулярных свойств *in silico* (программное обеспечение: Chems sketch, Dock Prep, PyMOL) для достижения оптимального диапазона положительного заряда и амфифильности для проникновения в клетку и связывания РНК. Наличие положительного заряда обеспечивалось включением остатков аргинина и гистидина в N-концевые области пептидных цепей. Другой дендримерный пептид ST-10 был изначально сконструирован для обеспечения выраженной противовирусной активности [19].

В данной работе мы оценивали антибактериальную активность панели катионных антимикробных пептидов в отношении лабораторного не инфекционного (без О-антигена) бактериального штамма *E. coli* Dh5 α как модели бактериальной клетки. Анализ активности проводили тремя методами: методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков, методом серийных разведений и методом подсчета колоний. Было показано, что из 35 синтезированных пептидов 12 пептидов обладают антибактериальной активностью в отношении *E. coli* Dh5 α . На основе полученных данных для дальнейших исследований были отобраны пептиды с наиболее выраженной антибактериальной активностью, а именно КК-46, Р-148-Cys (ПД), АВ-4, А-69 и ST-10. Метод диффузии в агар с использованием бумажных дисков, разработанный в 1940 году [5], является официальным методом, используемым во многих клинических микробиологических лабораториях для рутинного тестирования чувствительности к антимикробным препаратам. Тем не менее, поскольку не все виды и штаммы бактерий могут быть использованы в качестве модели в рамках данного метода, а полученные результаты недостаточно

отражают динамику бактерицидной активности катионных пептидов, было принято решение использовать для дальнейших исследований бактерицидной активности другие методы, а именно метод серийных разведений и метод подсчета колоний.

Метод серийных разведений используется для определения минимальной ингибирующей концентрации антимикробного препарата и, подобно методу диффузии в агар, является эталоном для тестирования восприимчивости к антимикробным препаратам [194]. Нами был выбран вариант этого метода, подразумевающий использование 96-луночных планшетов, позволяющий оптимизировать процесс анализа. Тем не менее, было обнаружено, что культивирование бактерий в присутствии некоторых из исследуемых КАМП (АВ-14, АВ-17, АВ-18; данные не представлены) вызывает увеличение мутности бактериальной суспензии, что сделало невозможным использование метода серийных разведений для оценки антибактериальной активности упомянутых пептидов. Таким образом, были получены данные МИК только для трех пептидов: А-69, ST-10, КК-46.

Для дальнейшей оценки бактерицидной активности КАМП был использован метод подсчета колоний с последующим расчетом МБК. Результаты показали, что исследуемые катионные пептиды дозозависимо ингибируют рост *E. coli* Dh5 α . Ориентируясь на полученные значения МБК, для дальнейших экспериментов были отобраны небольшие, легко синтезируемые пептиды с наиболее выраженной бактерицидной активностью: КК-46 (МБК 0,1566 mM), ST-10 (0,7740 mM), АВ-14 (0,0063 mM), АВ-17 (0,1517 mM) и АВ-18 (0,0245 mM). Далее, на их основе были разработаны комбинированные соединения с фуллереном C60.

В рамках первичного скрининга мы оценивали бактерицидную активность комбинированных соединений в отношении *E. coli* Dh5 α . Было показано, что катионные пептиды в составе конъюгатов и комплексов с фуллереном C60 сохраняют свою антибактериальную активность. Таким образом, МБК составили:

0,3018 mM и 0,6033 mM для ASM-45 и ASM-46, соответственно (конъюгаты на основе пептидов KK-46 и ST-10, соответственно), 0,1508 mM для K17 (комплекс на основе AB-17) и 0,0070 mM и 0,290 mM для K14 и K18, соответственно (комплексы на основе AB-14 и AB-18, соответственно). Поскольку наибольшую бактерицидную активность проявили комплексы K14, K17, K18, мы решили изучить их активность на расширенной панели бактериальных штаммов.

4.4 Антимикробная активность комбинированных соединений на примере штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки и устойчивых к антибиотикам

Потребность в поиске и разработке новых противомикробных препаратов, эффективных в отношении клинически-значимых патогенов с множественной лекарственной устойчивостью общепризнана. В связи с этим, на следующем этапе работы комплексы, продемонстрировавшие при первом скрининге наиболее выраженную бактерицидную активность, были изучены на предмет активности в отношении других патогенов, таких как *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* и *A. baumannii*, а также модифицированных по О-антигену *E. coli* (4SR, 4SI, 4SI). Результаты оценки антибактериальной активности наиболее перспективных комплексов K14, K17, K18 в сравнении с пептидами, входящими в их состав, представлены на рисунке 87. Виды бактерий для скрининга второго этапа были отобраны намеренно - упомянутые патогены, за исключением *S. agalactiae*, который также является важным клинически-значимым видом, входят в опубликованный Всемирной организацией здравоохранения список из 12 мультирезистентных бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. Устойчивость указанных видов бактерий к широко используемым антибактериальным препаратам и бактериофагам показана в таблице 22.

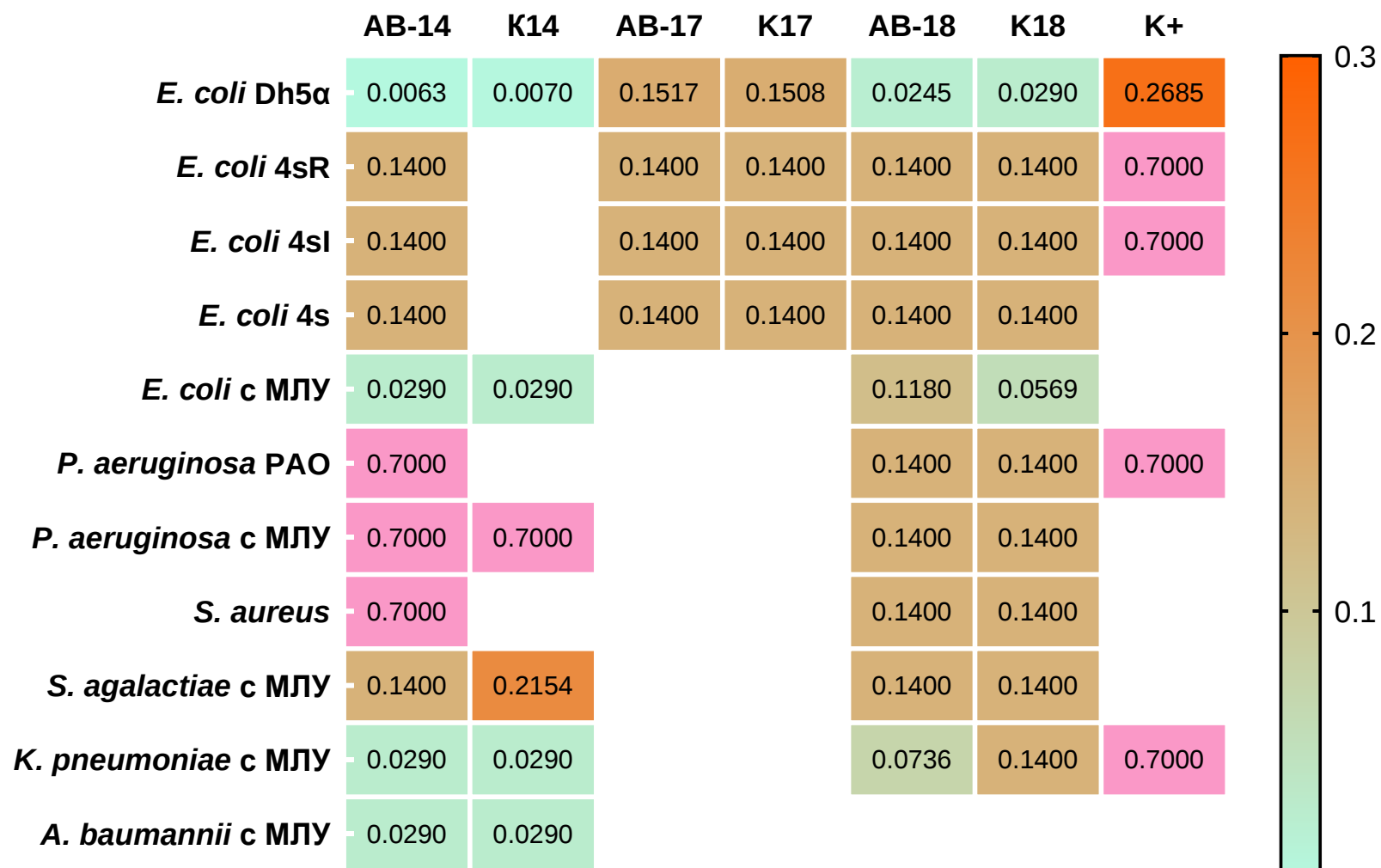


Рисунок 87 – Антибактериальная активность катионных пептидов (AB-14, AB-17, AB-18) и комплексов на их основе (K14, K17, K18) в отношении клинически значимых патогенных микроорганизмов. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Таблица 22 – Антибиотикограмма видов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью со стратификацией S-I-R. Приведенные числовые значения представляют собой МИК и выражены в мкг/мл. Отсутствующий результат S-I-R указывает на неподходящее сочетание микроорганизма и антимикробного препарата или фага. Общее микробное число составило: 10^7 КОЕ/мл (*E. coli*), 10^6 КОЕ/мл (*K. pneumoniae*), 10^6 КОЕ/мл (*P. aeruginosa*), 10^6 КОЕ/мл (*S. agalactiae*), 10^6 КОЕ/мл (*A. baumannii*)

Классы антибиотиков	Антимикробный препарат или бактериофаг	Виды бактерий				
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>A. baumannii</i>
Аминогликозиды	Амикацин, 30 мкг	6	6	6		19
	Гентамицин, 10 мкг	6	6			24
	Тобрамицин, 10 мкг			6		23
Карбапенемы	Имипенем, 10 мкг	6	19	20		6
	Меропенем, 10 мкг	6	14	6		6
Линкозамиды	Клиндамицин, 2 мкг				6	
Макролиды	Эритромицин, 15 мкг				10	
Монобактамы	Азтреонам, 30 мкг			20		
Пенициллины	Амоксициллин/клавуланат, 20 мкг + 10 мкг	6	11			
	Ампициллин, 10 мкг		6			
	Бензилпенициллин, 0,6 мкг				21	
	Пиперациллин, 30 мкг			16		
	Тикарциллин, 75 мкг			12		
Сульфаниламиды	Триметоприм/сульфаметокс, 1,25 мкг + 23,75 мкг	6	6			6
Тетрациклины	Тетрациклин, 30 мкг				15	
Фторхинолоны	Левифлоксацин, 5 мкг	6	6	6	19	6
	Моксифлоксацин, 5 мкг				22	
	Ципрофлоксацин, 5 мкг	6	6	6		6
Цефалоспорины	Цефепим, 30 мкг		9	22		
	Цефотаксим, 5 мкг	6	6			

S-I-R

-  S - чувствительный
 I - чувствительный при увеличенной экспозиции
 R - устойчивый

Продолжение таблицы 22

Классы антибиотиков	Антимикробный препарат или бактериофаг	Виды бактерий				
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>A. baumannii</i>
Цефалоспорины	Цефтазидим, 10 мкг	6	6	21		
Бактериофаги	Бактериофаг стрептококковый					
	Пиобактериофаг комплексный					
	Секстафаг (пиобактериофаг поливалентный)					

S-I-R

-  S - чувствительный
 I - чувствительный при увеличенной экспозиции
 R - устойчивый

Синегнойная палочка (*P. aeruginosa*), как распространенный условно-патогенный грам-отрицательный микроорганизм, является одной из основных причин внутрибольничных инфекций, приводящих к различным заболеваниям, таким как пневмония, бактериемия и инфекции мочевыводящих путей [74]. Люди с ослабленной иммунной системой, например, с заболеваниями обмена веществ, гематологическими заболеваниями и злокачественными опухолями, более восприимчивы к *P. aeruginosa* [55, 131]. Препараты, обычно используемые для лечения вызванных *P. aeruginosa* инфекций в клинических условиях, включают пенициллин, цефалоспорины, азтреонам, аминогликозиды, фторхинолоны и карбапенемы [16, 132], однако из-за неправильного применения антибиотиков устойчивость *P. aeruginosa* к карбапенемам и многим другим антибактериальным препаратам быстро возросла, в результате чего количество резистентных штаммов продолжает расти, что затрудняет клиническое лечение [132].

В результате оценки антибактериальной активности комплексов, K14 и K18, было выявлено, что K14, а также входящий в его состав пептид АВ-14, обладают бактерицидной активностью в отношении *P. aeruginosa*. МБК K14 и АВ-14 в отношении мультирезистентного штамма *P. aeruginosa* (резистентный к пиперациллину, тобрамицину, амикацину, ципрофлоксацину, тикарциллину, меропенему и частично устойчив к цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, имипенему) составила 0,7 mM. МБК K18 и АВ-18 в отношении *P. aeruginosa* РАО составила 0,14 mM.

Актуальным для изучения является также *S. aureus*, который вызывает широкий спектр инфекций, приводящих в тяжёлых случаях к полиорганной недостаточности и смерти. Это один из самых распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций во всем мире. Появление и быстрое распространение устойчивых, например, к метициллину штаммов *S. aureus* стало серьезной проблемой для терапии инфекционных заболеваний. Согласно данным литературы, новый фотосенсибилизатор S-PS [93], наночастицы серебра (AgNPs), противомикробный пептид субланцин [227], проникающие в клетки пептиды и

комбинированная антибиотикотерапия [239] обладают хорошей бактерицидной активностью в отношении *S. aureus* с множественной лекарственной устойчивостью, однако по-прежнему существует необходимость поиска альтернативных антибактериальных агентов, активных в отношении этого патогена. В настоящем исследовании было показано, что пептид АВ-14 обладает бактерицидной активностью в отношении *S. aureus* (МБК составило 0,7 mM), в то время как комплекс К14 на основе катионного пептида АВ-14 и фуллерена C60 не обладает таковой в отношении данного вида бактерий. Однако, АВ-18 проявлял бактерицидную активность в отношении *S. aureus* как самостоятельно, так и в составе комплекса с фуллереном C60 (МБК составило 0,14 mM), что говорит о способности фуллерена C60 влиять на антибактериальную активность пептидного компонента в составе комплекса и необходимости изучения каждого конкретного случая.

Klebsiella pneumoniae является причиной таких внутрибольничных инфекций, как инфекции мочевыводящих путей, пневмония и инфекция кровотока у госпитализированных или других пациентов с ослабленным иммунитетом. В 2019 году смертность от этой бактерии составила примерно от 200 000 до 650 000 случаев [75]. Неконтролируемое использование противомикробных препаратов привело к тому, что внутри вида *K. pneumoniae* также появились штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. В настоящей работе была выявлена бактерицидная активность комплекса К18 и его пептидного компонента АВ-18 в отношении *K. pneumoniae* (МБК составили 0,0736 mM для пептида и 0,14 mM для комплекса). Бактерицидная активность пептида АВ-14 и комплекса К14 в отношении указанного патогена была сопоставима с таковой АВ-18 (МБК составили 0,029 mM, 0,029 mM и 0,0736 mM, соответственно).

Далее в рамках настоящей работы была проведена оценка антибактериальной активности комплексов К14 и К18, а также пептидов АВ-14 и АВ-18, входящих в их состав, в отношении *Streptococcus agalactiae*. *S. agalactiae*,

или гемолитический стрептококк группы В, — условно-патогенный микроорганизм, колонизирующий мочеполовые и пищеварительные пути человека и вызывающий опасные для жизни осложнения при инвазивных инфекциях у беременных женщин. Этот вид бактерий также вызывает мастит у крупного рогатого скота и, как следствие, экономические потери для молочных ферм [17, 162]. Нами было показано, что АВ-14 обладает бактерицидной активностью в отношении *S. agalactiae* (МБК составила 0,14 mM), в то время как комплекс на основе АВ-14 с фуллереном C60 (K14) демонстрирует таковую ниже (МБК 0,2154 mM), что позволяет предположить способность фуллерена 60 негативно влиять на антибактериальную активность катионных пептидов. Что касается АВ-18 и комплекса на его основе (K18), то бактерицидная активность в отношении *S. agalactiae* характеризовалась МБК, составляющей 0,14 mM.

Бактерицидную активность пептида АВ-14 и комплекса K14 исследовали против *A. baumannii* – аэробной неферментирующей грам-отрицательной бактерии, способной колонизировать кожные покровы и слизистые оболочки [61, 246]. Данный вид признан критически значимым патогеном, входящим в приоритетный список ВОЗ из-за исключительной полирезистентности к антибиотикам (включая карбапенемы) и способности вызывать тяжелые нозокомиальные инфекции у пациентов отделений реанимации, ожоговых центров и лиц с иммунодефицитом. Широкая распространенность в стационарах и формирование биопленок на имплантатах превращают *A. baumannii* в одну из наиболее сложных проблем современной клинической микробиологии. МБК АВ-14 и K14 в отношении данного патогена составили 0,029 mM.

Также мы исследовали бактерицидную активность наиболее перспективных, на наш взгляд, комплексов и пептидов, входящих в их состав, в отношении дикого и мутантных штаммов *E. coli*. Среди них *E. coli* 4S являлся природным изолятом, выделенным из фекалий лошадей, с нормальным О-антигеном, в то время как 4SI и 4SR – мутантные штаммы с укороченным О-антигеном и без О-антигена, соответственно. Мультирезистентный штамм был

частично устойчив к имипенему и полностью устойчив к широкому ряду антибиотиков (цефотаксим, левофлоксацин, гентамицин, смесь триметоприм/сульфаметокс, смесь амоксициллин/клавуланат, цефтазидим, меропенем, амикацин, цiproфлоксацин). В настоящем исследовании пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18 демонстрировали бактерицидную активность (МБК 0,14 mM) в отношении штаммов кишечной палочки 4S, 4SI и 4SR. Следует отметить, что, данная активность сохранялась для указанных пептидов и в составе комплексов (K17 и K18).

Бактерицидную активность в отношении штамма *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью также оценивали для АВ-14 и АВ-18. МБК пептидов составила 0,0063 и 0,0245 mM, соответственно, при этом в составе комплексов оба пептида сохранили сопоставимый уровень бактерицидного действия.

Значительная вариабельность МБК АВ-14 в зависимости от вида бактерий указывает на высокоспецифичный механизм действия, критически зависящий от структурных особенностей клетки-мишени. Его высокая эффективность (низкая МБК) против грам-отрицательных МЛУ-патогенов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*) свидетельствует об оптимальном преодолении их специфических барьеров (например, особенности наружной мембраны/поринов). Напротив, сниженная эффективность (высокая МБК) против *P. aeruginosa* (сложноорганизованная наружная мембрана, эффлюкс-системы) и *S. aureus* (толстый пептидогликан) подчеркивает чувствительность АВ-14 к барьерам, нехарактерным для его целевой группы. Эта специфичность, вероятно, обусловлена необходимостью взаимодействия с уникальными компонентами поверхности (например, специфичными LPS, тейхоевыми кислотами) или зависимостью от состава мембраны, что определяет его узкую специализацию на ключевых грам-отрицательных МЛУ-патогенах, ограничивая универсальность, но обеспечивая высокую активность против целевой группы.

Стабильность МБК АВ-18 в отношении филогенетически и структурно разнородных бактерий (*P. aeruginosa* – грам-отрицательная со сложной наружной мембраной, *S. aureus* и *S. agalactiae* – грам-положительные с толстым пептидогликаном) указывает на потенциально универсальный механизм действия, слабо зависящий от специфики клеточных барьеров. Это позволяет предположить воздействие на консервативную мишень (например, основные компоненты цитоплазматической мембраны или жизненно важные внутриклеточные структуры). Этот механизм, по-видимому, малочувствителен к видовым особенностям поверхности, что отражается в стабильной эффективности и способности преодолевать разнородные защитные барьеры (наружная мембрана, пептидогликан). Такая предсказуемость активности повышает его перспективность как агента широкого спектра действия для терапии смешанных инфекций.

Таким образом, катионные пептиды АВ-14, АВ-17, АВ-18 и комплексы на их основе демонстрировали антибактериальную активность в отношении спектра клинически-значимых патогенов, в том числе мультирезистентных. Наиболее перспективным, на наш взгляд, являлось комплекс К18, которое было активно в отношении штаммов *E. coli* (Dh5 α , 4sR, 4sI, 4s, МЛУ), штаммов *P. aeruginosa* PAO и МЛУ, а также видов бактерий *S. aureus*, *S. agalactiae* и *K. pneumoniae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги. В результате проведенных исследований биологической активности новых комбинированных соединений на основе водной дисперсии немодифицированного фуллерена C60 и катионных пептидов установлено, что полученные соединения обладают противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью.

В рамках данной работы получена панель из 35 пептидов. Из 15 пептидов, проявивших активность, 2 обладали бактерицидной активностью в отношении клинически-значимых видов патогенов: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae* и 1 против *A. baumannii*, в том числе полирезистентных штаммов. Выявлено, что пептиды с наиболее выраженной бактерицидной активностью были нетоксичны для клеток млекопитающих в диапазоне концентраций 20-174 мкг/мл.

На основе катионных пептидов, проявивших наибольшую антибактериальную активность, и фуллерена C60 были получены комбинированные соединения. Установлено, что 9 соединений были способны в разной степени ингибировать рост штамма *E. coli* Dh5 α , а также демонстрировали бактерицидную активность в отношении данного штамма (значения МБК не более 0,9 мМ). Комплексы K14, K17 и K18 демонстрировали выраженную бактерицидную активность в отношении *E. coli* Dh5 α (МБК составили 0,0070 мМ, 0,1508 мМ и 0,0290 мМ, соответственно), а также показали активность в отношении других клинически-значимых патогенов (МБК преимущественно 0,14 мМ). Оценка цитотоксичности комбинированных соединений показала, что их профиль безопасности был сопоставим с таковым исходных пептидов.

На основе полученных данных, комплексы K14, K17 и K18 были отобраны для оценки противовоспалительной активности. Было показано, что профилактическое внутрибрюшинное введение растворов фуллерена C60 и комплексов на его основе за 24 часа и 1 час до введения эндотоксина способствует выживаемости мышей при моделировании состояния эндотоксического шока.

Результаты оценки уровня экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов показали, что комплексы K17 и K18 демонстрировали противовоспалительную активность, сравнимую с таковой, показанной для ВРФ.

В проведенных экспериментах на модели кожной раны *in vivo* показано, что степень ранозаживляющей активности ВРФ в составе комбинированных соединений с катионными пептидами варьируется в зависимости от структуры пептида. В результате анализа уровня экспрессии генов факторов, участвующих в процессе заживления ран, выявлено, что ВРФ сохранял ранозаживляющую активность в полном объеме в составе комплекса K18.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания комплексных препаратов на основе катионных пептидов и фуллерена C60, проявляющих одновременно антибактериальную, противовоспалительную и ранозаживляющую активности, которые могут стать конкурентноспособной перспективной альтернативой имеющейся терапии инфицированных ран и аллергопатологий, осложненных бактериальной инфекцией.

Рекомендации. Для оценки антибактериальной активности катионных пептидов и их комплексов с фуллереном C60, способных изменять оптическую плотность среды, рекомендуется применять метод подсчета колоний; для минимизации вариабельности индивидуальных реакций при моделировании эндотоксического шока *in vivo* рекомендуется использовать стандартизированный липополисахарид одной серии, а также генетически однородных животных одного пола, возраста и массы тела, содержащихся в идентичных условиях не менее 7 дней до начала эксперимента; рекомендуется перед основным исследованием проводить предварительное титрование LPS для конкретной партии животных с определением летальной или расчетом рабочей дозы с коррекцией на массу тела каждого животного.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Предметом дальнейших исследований является: изучение бактерицидной активности описанных в работе

катионных пептидов и комбинированных соединений с фуллереном C60 на их основе в отношении расширенной панели штаммов клинически-значимых видов бактерий; изучение влияния комбинированных соединений на экспрессию генов расширенного спектра факторов, участвующих в процессе развития системного воспаления, на модели эндотоксического шока *in vivo*; изучение экспрессии генов факторов воспаления при других схемах введения тестируемых соединений; изучение влияния комбинированных соединений фуллерена C60 и антибактериальных пептидов на экспрессию генов, участвующих в развитии системного воспаления, на разных этапах развития эндотоксического шока, а также влияния самих используемых катионных пептидов на экспрессию генов данных факторов; оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, в макрофагах при развитии эндотоксического шока *in vivo*; изучение расширенного спектра биологической активности комбинированных соединений на модели инфицированной раны *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что комбинированные соединения фуллерена C60 с пептидами АВ-14, АВ-17 и АВ-18 обладают противовоспалительной активностью, демонстрируя синергический эффект в подавлении воспалительного ответа.
2. Разработаны модели нелетального и летального эндотоксического шока как формы системного воспаления, позволяющие оценивать биологическую активность комбинированных препаратов фуллерена C60 и катионных пептидов.
3. Выявлено, что профилактическое введение водной дисперсии фуллерена C60 и его соединений с катионными пептидами при моделировании тяжелого эндотоксического шока предотвращает гибель животных, что сопровождается восстановлением баланса экспрессии генов *Il1rn/Il1b* и *Il10/Tnfa*. Установлена способность фуллерена C60 предотвращать патологическое нарушение экспрессии генов *Ifng* и *Adora2a*.
4. Показано, что комбинированные соединения фуллерена C60 с пептидами АВ-14 и АВ-18 обладают ранозаживляющей активностью за счет подавления экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Tnfa*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*), стимуляции экспрессии генов, отвечающих за заживление тканей без образования рубцов (*Il10*, *Tgfb1*), а также генов, участвующих в ангиогенезе (*Vegfa*, *Fgfb*) и нормализации кислородного баланса (*Hif1a*) в микроокружении раны. Выявлена корреляция между уровнями экспрессии генов *Hif1a* и филагтрина кератиноцитами.
5. Выявлено 15 синтетических катионных пептидов, обладающих бактерицидной активностью против *E. coli* Dh5 α , 3 - против патогенных штаммов *E. coli*, 2 - против *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae*, 1 – против *A. baumannii*, включая полирезистентные штаммы. Установлено, что наиболее эффективные пептиды КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18 безопасны для здоровых клеток млекопитающих в диапазоне концентраций 20-174 мкг/мл.

6. Показано, что линейные и дендримерные катионные пептиды (КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18) способны образовывать комбинированные соединения с фуллереном C₆₀, которые являются безопасными и сохраняют выраженную антибактериальную активность против клинически значимых грам-отрицательных и грам-положительных видов бактерий, в том числе полирезистентных штаммов.
7. На основе водной дисперсии фуллерена C₆₀ и синтетического катионного пептида АВ-18 получено комбинированное соединение К18, сочетающее противовоспалительную и ранозаживляющую активность фуллерена C₆₀, а также антибактериальную активность пептида.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

АМП – антимикробные пептиды

АМФ – аденозинмонофосфат

АФК – активные формы кислорода

ВРФ – водный раствор фуллерена

ДК – дендритные клетки

КАМП – катионные антимикробные пептиды

КП – катионные пептиды

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

Мф – макрофаги

Нф – нейтрофилы

ОП – оптическая плотность

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ТК – тучные клетки

УПП – устойчивость к противомикробным препаратам

С60 – молекула фуллерена, состоящая из 60 атомов углерода

DAMPs – damage-associated molecular patterns – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

EGF – epidermal growth factor – эпидермальный фактор роста

FGF-b – basic fibroblast growth factor – основной фактор роста фибробластов

HIF – hypoxia-inducible factor – фактор, индуцируемый гипоксией

HMGB1 – high-mobility group box 1 protein – белок высоко мобильной группы бокс 1

HPRT – hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза

LB – lysogeny broth – лизогенный бульон

IGF – insulin-like growth factor – инсулиноподобный фактор роста

IFN- γ – interferon gamma – интерферон гамма

IL – interleukin – интерлейкин

LPS – lipopolysaccharide – липополисахарид

MAPK – mitogen-activated protein kinase — митоген-активируемая протеинкиназа

MCP – monocyte chemoattractant protein — моноцитарный хемотаксический белок

MMP – matrix metalloproteinase – матричная металлопротеиназа

MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – метициллинрезистентный золотистый стафилококк

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns – молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами

PDGF – platelet-derived growth factor – фактор роста тромбоцитов

PRR – pattern recognition receptors – рецепторы распознавания образов

TGF – transforming growth factor – трансформирующий фактор роста

TLR – Toll-like receptor – Toll-подобный рецептор

TNF- α – tumor necrosis factor alpha – фактор некроза опухоли альфа

VEGF – vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баландин, С. В. Антимикробные пептиды беспозвоночных. Часть 2. Биологические функции и механизмы действия / С. В. Баландин, Т. В. Овчинникова // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 4. – С. 381–400.
2. Башкатова, Е. Н. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C₆₀ на реакцию гиперчувствительности замедленного типа / Е. Н. Башкатова, С. М. Андреев, Н. Н. Шершакова [и др.] // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2012. – Т. 16. – № 2. – С. 17-27.
3. Галкина, А. А. Катионные пептиды как перспективные соединения для терапии бактериальных осложнений при атопическом дерматите: оценка антибактериальной активности / А. А. Галкина, Д. К. Болякина, А. В. Шатилова [и др.] // Российский Аллергологический Журнал. – 2023. – Т. 20. – №4. – С. 387-401.
4. Галкина, А. А. Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена / А. А. Галкина, Д. К. Болякина, А. В. Шатилова [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2023. – №3. – С. 56-64.
5. Зверев, В. В. Историко-технологические аспекты определения чувствительности микробов к антибиотикам / В. В. Зверев, Ю. В. Несвижский, С. Н. Миндлин, Н. Ю. Тарасова // Сеченовский вестник. – 2016. – №1 (23). – С. 12-18.
6. Игнатов, И. Состав и структурные свойства природного фуллеренсодержащего минерала шунгита / И. Игнатов, О. В. Мосин // Нано- и микросистемная техника. – 2013. – № 1. – С. 21-26.
7. Ковалева, Е. В. Доклиническое изучение репродуктивной токсичности лекарственного средства на основе водного раствора фуллерена C₆₀, предназначенного для терапии пищевой аллергии / Е. В. Ковалева, Ю. В. Иванова, Н. М. Онацкий [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2025. – Т. 22. – № 2. – С. 153-164.

8. Ковылкова, С. Ю. Влияние фуллерена C60 на профиль экспрессии генов цитокинов дифференцированных клеток линии ТНР-1 / С. Ю. Ковылкова, В. Е. Брылина, Н. Н. Шершакова // Биология и биотехнология на службе охраны здоровья животных и человека : Материалы Национальной научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, Москва, 21 октября 2022 года. – Москва: Сельскохозяйственные технологии, 2022. – С. 22-29.
9. Молчанова, В. И. Сравнительное изучение биологической активности биогликанов из дальневосточной мидии *Crenomytilus grayanus* / В. И. Молчанова, И. В. Чикаловец, О. В. Черников [и др.] // Тихоокеанский Медицинский Журнал. – 2012. – № 1. – Р. 47–50.
10. Никонорова, В. Г. Факторы роста в восстановлении и формировании кожных рубцов. / В. Г. Никонорова, В. В. Криштоп, Т. А. Румянцева // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – Т. 12. – №1. – С. 102-112.
11. Оборотова, М. В. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток на клеточных линиях меланомы человека: 1 / М. В. Оборотова, О. С. Бурова, М. А. Барышникова [и др.] // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2015. – Т. 14. – № 1. – С. 11-14.
12. Ожован, И. М. Антимикробные пептиды и белки как факторы врожденного иммунитета при муковисцидозе / И. М. Ожован, В. Г. Арзуманян, М. П. Костинов, А. М. Иксанова // Международный научно-исследовательский журнал. – 2024. – №9 (147). – С. 16.
13. Озолия, Л. А. Современный взгляд на этиологию, патогенез, клинику и лечение воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин (обзор литературы) / Л. А. Озолия, Н. Н. Праведников, Н. Р. Овсепян // Вестник РГМУ. – 2013. – № 2. – С. 47-52.
14. Сидоров, Л. Н. Эндоэдральные металлопроизводные и экзоэдральные фторпроизводные фуллеренов / Л. Н. Сидоров, О. В. Болталиня // Успехи химии. – 2002. – Т. 71. – № 7. – С. 535-561.

15. Славский, А. Н. Системная стероидная терапия при острых воспалительных заболеваниях уха и верхних дыхательных путей / А. Н. Славский, И. Ю. Мейтель, Л. А. Топоркова, В. И. Фатьянова // Клиническая медицина. – 2017. – № 4. – С. 369-374.
16. Тапальский, Д. В. Препараты бактериофагов и комбинации антибиотиков: *in vitro* активность в отношении изолятов *Pseudomonas aeruginosa* st235 с экстремальной антибиотикорезистентностью / Д. В. Тапальский // КМАХ. – 2016. – Т. 18. – №4. – С. 242-248.
17. Чучукина, О. А. Состояние проблемы инфекций, вызываемых стрептококками серогруппы В, на современном этапе / О. А. Чучукина, И. А. Бочков // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2013. – №5.
18. Шамова, О. В. Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями / О. В. Шамова, М. С. Жаркова, А. Н. Чернов [и др.] // Российский журнал персонализированной медицины. – 2021. – Т. 1. – № 1. – С. 146-172.
19. Шатилов, А. А. Синтез и биологические свойства полифенол-содержащих катионных линейных и дендримерных пептидов / А. А. Шатилов, С. М. Андреев, А. В. Шатилова [и др.] // Биохимия. – 2024. – Т. 89. – №1. – С. 182-193.
20. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с. – ISBN 978-5-9704-1319-7.
21. Akira, S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // Cell. – 2006. – Vol. 124. – № 4. – P. 783-801.
22. Akira, S. Toll-like receptor signalling / S. Akira, K. Takeda // Nat. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 4. – № 7. – P. 499-511.
23. Albina, J. E. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 α induction in primary inflammatory cells by TNF- α / J. E. Albina, B. Mastrofrancesco, J. A. Vessella [et al.] // Am. J. Physiol.-Cell Physiol. – 2001. – Vol. 281. – № 6. – P. 1971–1977.

24. Aliyu, M. Interleukin-6 cytokine: an overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach / M. Aliyu, F. Zohora, A. Umar Anka [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2022. – Vol. 111. – P. 109-130.
25. Al-Jebouri, M. M. Estimation of Cytokines Involved in Acute-Phase Wound Infection with Reference to Residence Time of Patients in Hospitals / M. M. Al-Jebouri, B. Y. R. Al-Mahmood // *Mod. Res. Inflamm.* – 2019. – Vol. 08. – № 01. – P. 1–10.
26. Amarante-Mendes, G. P. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery / G. P. Amarante-Mendes, S. Adjemian, L. M. Branco [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – № 2379. – P. 1-19.
27. Ambite, I. Therapeutic effects of IL-1RA against acute bacterial infections, including antibiotic-resistant strains / I. Ambite, T. Tran, D. S. C. Butler [et al.] // *Pathogens.* – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 42.
28. Andersen, M. B. Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon / M. B. Andersen, J. Pingel, M. Kjær, H. Langberg // *J. Appl. Physiol.* – 2011. – Vol. 110. – № 6. – P. 1549–1554.
29. Andreev, I. M. Amino-acid derivatives of fullerene C60 behave as lipophilic ions penetrating through biomembranes / I. M. Andreev, V. S. Romanova, A. O. Petrukhina, S. M. Andreev // *Phys. Solid State.* – 2002. – Vol. 44. – № 4. – P. 683-685.
30. Andreev, I. Penetration of fullerene C60 derivatives through biological membranes / I. Andreev, A. Petrukhina, A. Garmanova [et al.] // *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures.* – 2008. – Vol. 16. – № 2. – P. 89-102.
31. Aoshima, H. Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives / H. Aoshima, K. Kokubo, S. Shirakawa [et al.] // *Biocontrol Sci.* – 2009. – Vol. 14. – № 2. – P. 69-72.
32. Ashcroft, G. S. The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model / G. S. Ashcroft, M. A. Horan, M. W. J. Ferguson // *J. Anat.* – 1997. – Vol. 190. – № 3. – P. 351–365.

33. Baati, T. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene / T. Baati, F. Bourasset, N. Gharbi [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33. – № 19. – P. 4936-4946.
34. Bacci, S. Cellular mechanisms and therapies in wound healing: looking toward the future / S. Bacci // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – № 11. – P. 1611.
35. Bacci, S. The epidermis in microgravity and unloading conditions and their effects on wound healing / S. Bacci, D. Bani // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 666434.
36. Bao, P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing / P. Bao, A. Kodra, M. Tomic-Canic [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2009. – Vol. 153. – № 2. – P. 347–358.
37. Barrientos, S. Perspective article: growth factors and cytokines in wound healing / S. Barrientos, O. Stojadinovic, M. S. Golinko [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16. – № 5. – P. 585–601.
38. Batista Araujo, J. Indolicidin revisited: biological activity, potential applications and perspectives of an antimicrobial peptide not yet fully explored / J. Batista Araujo, G. Sastre De Souza, E. N. Lorenzon // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 38. – № 3. – P. 39.
39. Batista, C. V. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta* / C. V. Batista, A. Scaloni, D. J. Rigden [et al.] // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 494. – № 1–2. – P. 85-89.
40. Beringer, P. M. Rhesus θ -defensin-1 (RTD-1) exhibits in vitro and in vivo activity against cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* / P. M. Beringer, T. J. Bensman, H. Ho [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – № 1. – P. 181-188.
41. Beutler, B. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin / B. Beutler, E. T. Rietschel // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 3. – № 2. – P. 169-176.
42. Bi, X. Antimicrobial properties and interaction of two Trp-substituted cationic antimicrobial peptides with a lipid bilayer / X. Bi, C. Wang, W. Dong [et al.] // *J. Antibiot.* – 2014. – Vol. 67. – № 5. – P. 361–368.

43. Biberoglu, S. Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) as a Biomarker in Trauma and Critical Care / S. Biberoglu, S. Ozkan // *Biomarkers in Trauma, Injury and Critical Care*. – 2023. – P. 859–874.
44. Biesmans, S. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice / S. Biesmans, T. Meert, J. A Bouwknecht [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 271-359.
45. Bin Hafeez, A. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases / A. Bin Hafeez, X. Jiang, P. J. Bergen, Y. Zhu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 21. – P. 11691.
46. Birchenough, G. M. H. Altered innate defenses in the neonatal gastrointestinal tract in response to colonization by neuropathogenic *Escherichia coli* / G. M. H. Birchenough, M. E. Johansson, R. A. Stabler [et al.] // *Infect. Immun.* – 2013. – Vol. 81. – № 9. – P. 3264-3275.
47. Boparai, J. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications / J. K. Boparai, P. K. Sharma // *Protein Pept. Lett.* – 2019. – Vol. 27. – № 1. – P. 4-16.
48. Borman, Z. A. The risk for opportunistic infections in inflammatory bowel disease with biologics: an update / Z. A. Borman, J. Côté-Daigneault, J.-F. Colombel // *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2018. – Vol. 12. – № 11. – P. 1101-1108.
49. Boucher, H. W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America / H. W. Boucher, G. H. Talbot, Bradley J. S. [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 48. – № 1. – P. 1-12.
50. Brady, D. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications / D. Brady, A. Grapputo, O. Romoli, F. Sandrelli // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – № 23. – P. 5862.
51. Brahma, B. Diversity, antimicrobial action and structure-activity relationship of buffalo cathelicidins / B. Brahma, M. C. Patra, S. Karri [et al.] // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – № 12. – P. e0144741.

52. Brannon, E. R. Polymeric particle-based therapies for acute inflammatory diseases / E. R. Brannon, M. V. Guevara, N. J. Pacifici [et al.] // *Nat. Rev. Mater.* – 2022. – Vol. 7. – № 10. – P. 796-813.
53. Brinkworth, J. F. Sepsis and the evolution of human increased sensitivity to lipopolysaccharide / J. F. Brinkworth, N. Valizadegan // *Evol. Anthropol.* – 2021. – Vol. 30. – № 2. – P. 141-157.
54. Brown, K. A. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis / K. A. Brown, S. D. Brain, J. D. Pearson [et al.] // *The Lancet.* – 2006. – Vol. 368. – № 9530. – P. 157-169.
55. Burrows, L. L. The Therapeutic Pipeline for *Pseudomonas aeruginosa* Infections / L. L. Burrows // *ACS Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 4. – № 7. – P. 1041–1047.
56. Busse, H. Adenosine A2a and A2b receptor substantially attenuate ischemia/reperfusion injury in septic rat hearts / H. Busse, D. Bitzinger, K. Höcherl [et al.] // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2016. – Vol. 30. – № 6. – P. 551–558.
57. Calvani, M. Hypoxic induction of an HIF-1 α -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells / M. Calvani, A. Rapisarda, B. Uranchimegy [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 107. – № 7. – P. 2705–2712.
58. Campo, S. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression / S. Campo, S. Manrique, J. García-Martínez, B. San Segundo // *Plant Biotechnol. J.* – 2008. – Vol. 6. – № 6. – P. 585-608.
59. Cândido, E. S. Short cationic peptide derived from Archaea with dual antibacterial properties and anti-infective potential / E. S. Cândido, M. H. Cardoso, L. Y. Chan [et al.] // *ACS Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 5. – № 7. – P. – 1081–1086.
60. Cañedo-Dorantes, L. Skin acute wound healing: a comprehensive review / L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala // *Int. J. Inflamm.* – 2019. – P. 1-15.
61. Carvalheira, A., Silva, J., and Teixeira, P. *Acinetobacter* spp. in food and drinking water - a review / A. Carvalheira, J. Silva, P. Teixeira // *Food Microbiol.* – 2021. – Vol. 95. – 103675.

62. Casciaro, B. Gold-nanoparticles coated with the antimicrobial peptide esculentin-1a(1-21)NH₂ as a reliable strategy for antipseudomonal drugs / B. Casciaro, M. Moros, S. Rivera-Fernández [et al.] // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 47. – P. 170-181.
63. Castellheim, A. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis / A. Castellheim, O.-L. Brekke, T. Espevik [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 69. – № 6. – P. 479-491.
64. Cavaillon, J. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads / J. Cavaillon, M. Singer, T. Skirecki // *EMBO Mol. Med.* – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 10128.
65. Čerovský, V. Lasioglossins: three novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae) / V. Čerovský, M. Buděšínský, O. Hovorka [et al.] // *ChemBioChem.* – 2009. – Vol. 10. – № 12. – P. 2089-2099.
66. Chandler, C. E. Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / C. E. Chandler, A. M. Horspool, P. J. Hill [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2019. – Vol. 201. – № 5. – P. e00595-18.
67. Chattopadhyay, S. Small cationic protein from a marine turtle has beta-defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity / S. Chattopadhyay, N. K. Sinha, S. Banerjee [et al.] // *Proteins.* – 2006. – Vol. 64. – № 2. – P. 524-531.
68. Chaudhry, H. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis / H. Chaudhry, J. Zhou, Y. Zhong [et al.] // *Vivo Athens Greece.* – 2013. – Vol. 27. – № 6. – P. 669–684.
69. Chen, C. H. Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications / C. H. Chen, T. K. Lu // *Antibiotics.* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 24.
70. Chen, G. Y. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage / G. Y. Chen, G. Nuñez // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – № 12. – P. 826-837.
71. Chen, J. F. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? / J. F. Chen, H. K. Eltzschig, B. B. Fredholm // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2013. – Vol. 12. – № 4. – P. 265–286.

72. Chen, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs / L. Chen, H. Deng, H. Cui [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 9. – № 6. – P. 7204–7218.
73. Chen, N. Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification / N. Chen, C. Jiang // *Eur. J. Med. Chem.* – 2023. – Vol. 255. – P. 115377.
74. Chen, X. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of natural antimicrobial peptides when used alone or in combination with antibiotics / X. Chen, S. Su, Y. Yan [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2023. – Vol. 14. – P. 1239540.
75. Chen, X. Exploration of antimicrobial peptides in the treatment of gentamicin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection / X. Chen, B. Zhang, J. He [et al.] // *Infect. Drug Resist.* – 2024. – Vol. 17. – P. 2591–2605.
76. Chen, X. The effect of porcine ADM to improve the burn wound healing / X. Chen, Y. Shi, B. Shu [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2013. – Vol. 6. – № 11. – P. 2280–2291.
77. Cialdai, F. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space / F. Cialdai, C. Risaliti, M. Monici // *Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers*. – 2022. – Vol. 10.
78. Cisneros-Segura, J. A. Sepsis Impairs IFN- γ Production in CD8 T Cells through Changes in Local Chromatin Landscape / J. A. Cisneros-Segura, N. Rodríguez-Rodríguez, A. Albarrán-Godínez [et al.] // *J. Immunol.* – 2024. – Vol. 213. – № 5. – P. 619–627.
79. Condotta, S. A. Polymicrobial sepsis increases susceptibility to chronic viral infection and exacerbates CD8⁺ T cell exhaustion / S. A. Condotta, S. H. Khan, D. Rai [et al.] // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 195. – № 1. – P. 116–125.
80. Condotta, S. A. Sustained and incomplete recovery of naive CD8⁺ T cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8⁺ T cell responses to infection / S. A. Condotta, D. Rai, B. R. James [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – № 5. – P. 1991–2000.

81. Corzo, C. A HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment / C. A Corzo, T. Condamine, L. Lu [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2010. – Vol. 207. – № 11. – P. 2439–2453.
82. Corzo, G. Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins / G. Corzo, E. Villegas, F. Gómez-Lagunas [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – № 26. – P. 23627–23637.
83. Cresti, L. Antimicrobial peptides towards clinical application—a long history to be concluded / L. Cresti, G. Cappello, A. Pini // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25. – № 9. – P. 4870.
84. Cuzzocrea, S. Role of interleukin-6 in a non-septic shock model induced by zymosan / S. Cuzzocrea, G. de Sarro, G. Costantino [et al.] // *Eur. Cytokine Netw.* – 1999. – Vol. 10. – № 2. – P. 191–203.
85. Danahy, D. B. Polymicrobial sepsis alters antigen-dependent and independent memory CD8 T cell functions / D. B. Danahy, S. M. Anthony, I. J. Jensen [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – № 8. – P. 3618–3625.
86. Danahy, D. B. Sepsis-induced state of immunoparalysis is defined by diminished CD8 T cell-mediated antitumor immunity / D. B. Danahy, S. P. Kurup, C. S. Winborn [et al.] // *J. Immunol.* – 2019. – Vol. 203. – № 3. – P. 725–735.
87. Dash, R. Thanatin: An Emerging Host Defense Antimicrobial Peptide with Multiple Modes of Action / R. Dash, S. Bhattacharjya // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 4. – P. 1522.
88. De Bosscher, K. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators / K. De Bosscher, G. Haegeman, D. Elewaut // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 10. – № 4. – P. 497–504.
89. de Breij, A. The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms / A. de Breij, M. Riool, R. A. Cordfunke [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2018. – Vol. 10. – № 423. – P. 4044.

90. De Mandal, S. Antimicrobial peptides: novel source and biological function with a special focus on entomopathogenic nematode/bacterium symbiotic complex / S. De Mandal, A. K. Panda, C. Murugan [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 555022.
91. Dean, R. E. A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes / R. E. Dean, L. M. O'Brien, J. E. Thwaite // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31. – № 11. – P. 1966-1972.
92. Deigin, V. I. Development of peptide biopharmaceuticals in Russia / V. I. Deigin, E. A. Poluektova, A. G. Beniashvili [et al.] // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 716.
93. Deitch, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection / E. A. Deitch // *Shock.* – 2005. – vol. 24. – № 1. – P. 19–23.
94. Delan, M. J. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis / M. J. Delan, P. O. Scumpia, J. S. Weinstein [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2007. – Vol. 204. – № 6. – P. 1463–1474.
95. Deptuła, M. Antibacterial peptides in dermatology—strategies for evaluation of allergic potential / M. Deptuła, A. Wardowska, M. Dzierżyńska [et al.] // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 414.
96. Din, F. U. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors / F. U. Din, W. Aman, I. Ullah [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 7291-7309.
97. Dinarello, C. A. Anti-cytokine therapies in response to systemic infection / C. A. Dinarello // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* – 2001. – Vol. 6. – № 3. – P. 244–250.
98. Dugan, L. L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders / L. L. Dugan, E. G. Lovett, K. L. Quick [et al.] // *Parkinsonism Relat. Disord.* – 2001. – Vol. 7. – № 3. – P. 243-246.

99. Eddie, W. K. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages / W. K. Eddie, N. Hoshi, D. S. Shouval [et al.] // *Science*. – 2017. – Vol. 356. – № 6337. – P. 513–519.
100. El Shazely, B. In vivo exposure of insect AMP resistant *Staphylococcus aureus* to an insect immune system / B. El Shazely, A. Urbanski, P. R. Johnston, J. Rolff // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 110. – P. 60-68.
101. Emelyantsev, S. Biological Effects of C60 Fullerene Revealed with Bacterial Biosensor - Toxic or Rather Antioxidant? / S. Emelyantsev, E. Prazdnova, V. Chistyakov, I. Alperovich // *Biosensors*. – 2019. – Vol. 9. – № 2. – P. 81.
102. Fathi, N. Lymphopenia in COVID-19: therapeutic opportunities / N. Fathi, N. Rezaei // *Cell Biol. Int.* – 2020. – Vol. 44. – № 9. – P. 1792-1797.
103. Fernández-Guarino, M. Cellular and molecular processes in wound healing / M. Fernández-Guarino, M. L. Hernández-Bule, S. Bacci // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 9. – P. 2526.
104. Fink, M. P. Animal models of sepsis / M. P. Fink // *Virulence*. – 2014. – Vol. 5. – № 1. – P. 143–153.
105. Firmal, P. Insight into TLR4-mediated immunomodulation in normal pregnancy and related disorders / P. Firmal, V. K. Shah, S. Chattopadhyay // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 807.
106. Fleming, A. Allison V. Further Observations on a Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. Royal Society of London, 1922.
107. Foster, D. M. Endotoxic Septic Shock: Diagnosis and Treatment / D. M. Foster, J. A. Kellum // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 22. – P. 16185.
108. Fu, X. Interferon- γ regulates immunosuppression in septic mice by promoting the Warburg effect through the PI3K/AKT/mTOR pathway / F. X, Y. Wang // *Mol. Med.* – 2023. – Vol. 29. – № 1. – P. 95.
109. Galván-Peña, S. Metabolic reprogramming in macrophage polarization / S. Galván-Peña, L. A. J. O'Neill // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5.

110. Garlanda, C. Decoys and regulatory “receptors” of the IL-1/Toll-Like Receptor superfamily / C. Garlanda, F. Riva, E. Bonavita [et al.] // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4.
111. Giantulli, S. Effect of 1-MHz ultrasound on the proinflammatory interleukin-6 secretion in human keratinocytes / S. Giantulli, E. Tortorella, F. Brasili [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 19033.
112. Godwin, A. Receptor-interacting protein kinase 3 deficiency delays cutaneous wound healing / A. Godwin, A. Sharma, W. L. Yang [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – № 10. – P. 0140514.
113. Gonzalez, M. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* / M. Gonzalez, Y. Gueguen, G. Desserre [et al.] // *Dev. Comp. Immunol.* – 2007. – Vol. 31. – № 4. – P. 332-339.
114. Graf, M. Intracellular Antimicrobial Peptides Targeting the Protein Synthesis Machinery / M. Graf, D. N. Wilson // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2019. – Vol. 1117. – P. 73-89.
115. Gralinski, L. E. Complement activation contributes to severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis / L. E. Gralinski, T. P. Sheahan, T. E. Morrison [et al.] // *mBio.* – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. e01753-18.
116. Grellner, W. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds / W. Grellner, T. Wilske // *Forensic Sci. Int.* – 2000. – Vol. 113. – № 1–3. – P. 251–264.
117. Gulhar, R. Physiology, Acute Phase Reactants / R. Gulhar, M. A. Ashraf, I. Jialal // *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* – 2023.
118. Halle, W. [Prediction of LD50 values by cell culture] / W. Halle, E. Göres // *Pharm.* – 1987. – Vol. 42. – № 4. – P. 245–248.
119. Han, Z. MiR-21/PTEN axis promotes skin wound healing by dendritic cells enhancement / Z. Han, Y. Chen, Y. Zhang [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2017. – Vol. 118. – № 10. – P. 3511-3519.

120. Hao, G. The intracellular mechanism of action on *Escherichia coli* of BF2-A/C, two analogues of the antimicrobial peptide Buforin 2 / G. Hao, Y. H. Shi, Y. L. Tang, G. W. Le // *J. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51. – № 2. – P. 200-206.
121. Harris, F. Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms / F. Harris, S. Dennison, D. Phoenix // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – № 6. – P. 585-606.
122. Hata, T. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1 / T. Hata, R. Tanaka, S. Ohmomo // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 137. – № 1. – P. 94-99.
123. Higgs, R. Modification of chicken avian beta-defensin-8 at positively selected amino acid sites enhances specific antimicrobial activity / R. Higgs, D. J. Lynn, S. Cahalane [et al.] // *Immunogenetics.* – 2007. – Vol. 59. – № 7. – P. 573-580.
124. Hirsch, J. G. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes / J. G. Hirsch // *J. Exp. Med.* – 1956. – Vol. 103. – № 5. – P. 589-611.
125. Horeczko, T. Epidemiology of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in the emergency department / T. Horeczko, J. Green, E. Panacek // *West. J. Emerg. Med.* – 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 329–336.
126. Horiuchi, T. Complement-targeted therapy: development of C5- and C5a-targeted inhibition / T. Horiuchi, H. Tsukamoto // *Inflamm. Regen.* – 2016. – Vol. 36. – № 1. – P. 11.
127. Howard, M. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia / M. Howard, T. Muchamuel, S. Andrade, S. Menon // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 177. – № 4. – P. 1205–1208.
128. Huan, Y. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields / Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, H. Yi // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 582779.
129. Hui, M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of liposoluble C60 at the cellular, molecular, and whole-animal levels / M. Hui, X. Jia, X. Li [et al.] // *J. Inflamm. Res.* – 2023. – Vol. 16. – P. 83-93.

130. Isozumi, N. Structure and antimicrobial activity of NCR169, a nodule-specific cysteine-rich peptide of *Medicago truncatula* / N. Isozumi, Y. Masubuchi, T. Imamura [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 9923.
131. Jäger, A. V. The inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages enhances apoptotic cell removal / A. V. Jäger, P. Arias, M. V. Tribulatti [et al.] // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 2393.
132. Jangra, V. Therapeutic approaches for combating *Pseudomonas aeruginosa* infections / V. Jangra, N. Sharma, A. K. Chhillar // *Microbes Infect.* – 2022. – Vol. 24. – № 4. – P. 104-950.
133. Jiang, W. Immune modulation by mesenchymal stem cells / W. Jiang, J. Xu // *Cell Prolif.* – 2020. – Vol. 53. – № 1. – P. e12712.
134. Jianhui, L. Endotoxin impairs cardiac hemodynamics by affecting loading conditions but not by reducing cardiac inotropism / L. Jianhui, N. Rosenblatt-Velin, N. Loukili [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 299. – № 2. – P. 492-501.
135. Johnson, B. Z. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing / B. Z. Johnson, A. W. Stevenson, C. M. Prêle [et al.] // *Biomedicines.* – 2020. – Vol. 8. – № 5. – P. 101.
136. Jorgovanovic, D. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review / D. Jorgovanovic, M. Song, L. Wang, Y. Zhang // *Biomark. Res.* – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 49.
137. Kaneko, N. The role of interleukin-1 in general pathology / N. Kaneko, M. Kurata, T. Yamamoto [et al.] // *Inflamm. Regen.* – 2019. – Vol. 39. – № 1. – P. 12.
138. Kapil, S. d -Amino acids in antimicrobial peptides: a potential approach to treat and combat antimicrobial resistance / S. Kapil, V. Sharma // *Can. J. Microbiol.* – 2021. – Vol. 67. – № 2. – P. 119-137.
139. Kassasseya, C. Divergent effects of tumor necrosis factor (TNF) in sepsis: a meta-analysis of experimental studies / C. Kassasseya, L. Torsin, C. Musset [et al.] // *Crit. Care.* – 2024. – Vol. 28. – № 1. – P. 293.

140. Kawai, T. TLR signalling / T. Kawai, S. Akira // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13. – № 5. – P. 816-825.
141. Kellum, J. A. The role of endotoxin in septic shock / J. A. Kellum, C. Ronco // *Crit. Care.* – 2023. – Vol. 27. – № 1. – P. 400.
142. Kerenga, B. K. Salt-tolerant antifungal and antibacterial activities of the corn defensin ZmD32 / B. K. Kerenga, J. A. McKenna, P. J. Harvey [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 795.
143. Khaitov, M. Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation / M. Khaitov, A. Nikonova, I. Shilovskiy [et al.] // *Allergy.* – 2021. – Vol. 76. – № 9. – P. 2840–2854.
144. Kim, E. Y. Post-sepsis immunosuppression depends on NKT cell regulation of mTOR/IFN- γ in NK cells / E. Y. Kim, H. Ner-Gaon, J. Varon [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2020. – Vol. 130. – № 6. – P. 3238–3252.
145. Kirby, A. J. The lysozyme mechanism sorted - After 50 years / A. J. Kirby // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 8. – № 9. – P. 737-739.
146. Klimova, R. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections / R. Klimova, S. Andreev, E. Momotyuk [et al.] // *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures.* – 2020. – Vol. 28. – № 6. – P. 487-499.
147. Knirel, Y. A. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s / Y. A. Knirel, N. S. Prokhorov, A. S. Shashkov [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2015. – Vol. 197. – № 5. – P. 905-912.
148. Kolaczowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 159-175.
149. Korneev, K. V. Mouse Models of Sepsis and Septic Shock / K. V. Korneev // *Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 53. – № 5. – P. 704–717.
150. Kuhns, D. B. Increased circulating cytokines, cytokine antagonists, and e-selectin after intravenous administration of endotoxin in humans / D. B. Kuhns, W. G. Alvord, J. I. Gallin // *J. Infect. Dis.* – 1995. – Vol. 171. – № 1. – P. 145–152.

151. Lakshmikanth, C. L. Sepsis: in search of cure / C. L. Lakshmikanth, S. P. Jacob, V. H. Chaithra [et al.] // *Inflamm. Res.* – 2016. Vol. 65. – № 8. – P. 587–602.
152. Lauw, F. Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin / F. Lauw, T. Hove, P. Dekkers [et al.] // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – № 3. – P. 1014–1018.
153. Lawrence, T. Chronic inflammation: a failure of resolution? / T. Lawrence, D. W. Gilroy // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2007. – Vol. 88. – № 2. – P. 85-94.
154. Lazzaro, B. P. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution / B. P. Lazzaro, M. Zasloff, J. Rolff // *Science.* – 2020. – Vol. 368. – № 6490. – P. eaau5480.
155. Lei, J. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications / J. Lei, L. Sun, S. Huang [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2019. – Vol. 11. – № 7. – P. 3919–3931.
156. Leligdowicz, A. Heterogeneity in sepsis: new biological evidence with clinical applications / A. Leligdowicz, M. A. Matthay // *Crit. Care.* – 2019. – Vol. 23. – № 1. – P. 80.
157. Li, C. De novo synthetic antimicrobial peptide design with a recurrent neural network / C. Li, D. Sutherland, A. Richter [et al.] // *Protein Sci.* – 2024. – Vol. 33. – № 8. – e5088.
158. Li, Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity / Y. Li, W. Wang, F. Yang [et al.] // *Cell Commun. Signal.* – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 147.
159. Lin, Y. L. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C3 isomer / Y. L. Lin, H. Y. Lei, Y. Y. Wen [et al.] // *Virology.* – 2000. – Vol. 275. – № 2. – P. 258-262.
160. Liu, C. The value of interleukin-6 (IL-6) within 6 hours after birth in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis / C. Liu, C. Fang, Q. He, L. Xie [et al.] // *Transl. Pediatr.* – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 629–635.
161. Liu, J. Screening cytokine/chemokine profiles in serum and organs from an endotoxic shock mouse model by LiquiChip / J. Liu, J. Wang, H. Luo [et al.] // *Sci. China Life Sci.* – 2017. – Vol. 60. – № 11. – P. 1242–1250.

162. Liu, Y. Group B Streptococcus: Virulence Factors and Pathogenic Mechanism / Y. Liu, J. Liu // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – № 12. – P. 2483.
163. Liu, Z. Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis / Z. Liu, S. Yan, J. Wang [et al.] // *Nat. Commun.* – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 584.
164. Lohans, C. T. Biochemical, structural, and genetic characterization of tridecaptin A₁, an antagonist of *Campylobacter jejuni* / C. T. Lohans, M. J. van Belkum, S. A. Cochrane [et al.] // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* – 2014. – Vol. 15. – № 2. – P. 243-249.
165. Lui, P. Jagged-1+ skin Tregs modulate cutaneous wound healing / Prudence / P. Lui, J. Z. Xu, H. Aziz [et al.] // *Sci. Rep.* – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 20999.
166. Lutty, G. Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine / G. A Lutty, D. S. McLeod // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2003. – Vol. 22. – № 1. – P. 95–111.
167. Lyu, W. Transcriptional Regulation of Antimicrobial Host Defense Peptides / W. Lyu, A. R. Curtis, L. T. Sunkara, G. Zhang // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – № 7. – P. 672-679.
168. Mackay, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies / C. R. Mackay // *Nat. Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – № 9. – P. 988-998.
169. Macleod, T. The immunological impact of IL-1 family cytokines on the epidermal barrier / T. Macleod, A. Berekmeri, C. Bridgewood [et al.] // *Front. Immunol. Frontiers*. – 2021. – Vol. 12.
170. Mahlapuu, M. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges / M. Mahlapuu, C. Björn, J. Eklom // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 40. – № 7. – P. 978-992.
171. Mangalmurti, N. Cytokine storms: understanding COVID-19 / N. Mangalmurti, C. A. Hunter // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53. – № 1. – P. 19-25.

172. Manrique-Caballero, C. L. Sepsis-Associated Acute Kidney Injury / C. L. Manrique-Caballero, G. Del Rio-Pertuz, H. Gomez // *Crit. Care Clin.* – 2021. – Vol. 37. – № 2. – P. 279–301.
173. Mansour, S. C. Host defense peptides: front-line immunomodulators / S. C. Mansour, O. M. Pena, R. E. W. Hancock // *Trends Immunol.* – 2014. – Vol. 35. – № 9. – P. 443-450.
174. Mashino, T. Development of Bio-active Fullerene Derivatives Suitable for Drug / T. Mashino // *Yakugaku Zasshi.* – 2022. – Vol. 142. – № 2. – P. 165-179.
175. McDermott, A. M. Defensins and other antimicrobial peptides at the ocular surface / A. M. McDermott // *Ocul. Surf.* – 2004. – Vol. 2. – № 4. – P. 229-247.
176. Medini, K. Synthesis and activity of a diselenide bond mimetic of the antimicrobial protein caenopore-5 / K. Medini, P. W. R. Harris, A. Menorca [et al.] // *Chem. Sci.* – 2016. – Vol. 7. – № 3. – P. 2005-2010.
177. Mergaert, P. Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations / P. Mergaert // *Nat. Prod. Rep.* – 2018. – Vol. 35. – № 4. – P. 336-356.
178. Metzemaekers, M. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords / M. Metzemaekers, M. Gouwy, P. Proost // *Cell. Mol. Immunol.* – 2020. – Vol. 17. – № 5. – P. 433-450.
179. Michie, H. R. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration / H. R. Michie, K. R. Manogue, D. R. Spriggs [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 318. – № 23. – P. 1481–1486.
180. Mignogna, G. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata* / G. Mignogna, M. Simmaco, G. Kreil, D. Barra // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – № 12. – P. 4829-4832.
181. Minshawi, F. The generation of an engineered interleukin-10 protein with improved stability and biological function / F. Minshawi, S. Lanvermann, E. McKenzie [et al.] // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1794.
182. Moioffer, S. J. Severity of sepsis determines the degree of impairment observed in circulatory and tissue-resident memory CD8 T cell populations / S. J. Moioffer, D. B.

- Danahy, S. van de Wall [et al.] // J. Immunol. – 2021. – Vol. 207. – № 7. – P. 1871–1881.
183. Monika, P. Myofibroblast progeny in wound biology and wound healing studies / P. Monika, P. V. Waiker, M. N. Chandrababha [et al.] // Wound Repair Regen. – 2021. – Vol. 29. – № 4. – P. 531-547.
184. Montesinos, M. C. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors / M. C. Montesinos, A. Desai, J.-F. Chen [et al.] // Am. J. Pathol. – 2002. – Vol. 160. – № 6. – P. 2009–2018.
185. Moore, C. C. An A2A adenosine receptor agonist, ATL313, reduces inflammation and improves survival in murine sepsis models / C. C. Moore, E. N. Martin, G. H. Lee [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2008. – Vol. 8. – P. 141.
186. Moretta, A. Antimicrobial peptides: a new hope in biomedical and pharmaceutical fields / A. Moretta, C. Scieuzo, A. M. Petrone [et al.] // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – P. 668632.
187. Munoz, C. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis / C. Munoz, J. Carlet, C. Fitting [et al.] // J. Clin. Invest. – 1991. – Vol. 88. – № 5. – P. 1747–1754.
188. Murakami, M. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin / M. Murakami, T. Ohtake, R. A. Dorschner [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2002. – Vol. 119. – № 5. – P. 1090-1095.
189. Mygind, P. H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus / P. H. Mygind, R. L. Fischer, K. M. Schnorr [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 437. – № 7061. – P. 975-980.
190. Nagata, K. IL-10 in Mast Cell-Mediated Immune Responses: Anti-Inflammatory and Proinflammatory Roles / K. Nagata, C. Nishiyama // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 4972.
191. Nakatsuji, T. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas / T. Nakatsuji, R. L. Gallo // J. Invest. Dermatol. – 2012. – Vol. 132. – № 3. – P. 887-895.

192. Nauta, T. D. Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine / T. D. Nauta, V. W. M. van Hinsbergh, P. Koolwijk // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15. – № 11. – P. 19791–19815.
193. Navegantes, K. C. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity / K. C. Navegantes, R. de Souza Gomes, P. A. T. Pereira [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 36.
194. Nayef, A. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution / A. Nayef // *Clin. Microbiol. Infect. Elsevier.* – 2003. – Vol. 9. – № 8. – P. 9–15.
195. Nemzek, J. A. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being / J. A. Nemzek, K. M. S. Hugunin, M. R. Opp // *Comp. Med.* – 2008. – Vol. 58. – № 2. – P. 120–128.
196. Neshani, A. LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens / A. Neshani, H. Zare, M. R. A. Eidgahi [et al.] // *Gene Rep.* – 2019. – Vol. 17. – P. 100519.
197. Ngamsri, K. Sevoflurane dampens acute pulmonary inflammation via the adenosine receptor A2B and heme oxygenase-1 / K. Ngamsri, A. Fuhr, K. Schindler [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 7. – P. 1094.
198. Niemeyer–van Der Kolk, T. Topical antimicrobial peptide omiganan recovers cutaneous dysbiosis but does not improve clinical symptoms in patients with mild to moderate atopic dermatitis in a phase 2 randomized controlled trial / T. Niemeyer–van Der Kolk, T. P. Buters, L. Krouwels [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2022. – Vol. 86. – № 4. – P. 854-862.
199. Niu, X. Protective effects of esculentin acid against endotoxic shock in Kunming mice / X. Niu, Q. Mu, W. Li [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2014. – Vol. 23. – № 1. – P. 229–235.

200. Nosbaum, A. Cutting edge: regulatory T Cells facilitate cutaneous wound healing / A. Nosbaum, N. Prevel, H. A. Truong [et al.] // J. Immunol. – 2016. – Vol. 196. – № 5. – P. 2010-2014.
201. Oberdörster, E. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C60) on aquatic organisms / E. Oberdörster, S. Zhu, T. M. Blickley [et al.] // Carbon. – 2006. – Vol. 44. – № 6. – P. 1112-1120.
202. Oberdörster, E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass / E. Oberdörster // Environ Health Perspect. – 2004. – Vol. 112. – № 10. – P. 1058-1062.
203. Ohtani, K. Complete Primary Structures of Two Subunits of Purothionin A, a Lethal Protein for Brewer's Yeast from Wheat Flour / K. Ohtani, T. Okada, H. Yoshizumi, H. Kagamiyama // J. Biochem. – 1977. – Vol. 82. – № 3. – P. 753-767.
204. Olson, T. S. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking / T. S. Olson, K. Ley // Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2002. – Vol. 283. – № 1. – P. R7-R28.
205. Orivel, J. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii* / J. Orivel, V. Redeker, J. P. Le Caer [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – № 21. – P. 17823-17829.
206. Papandreou, I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / I. Papandreou, R. A Cairns, L. Fontana [et al.] // Cell Metab. – 2006. – Vol. 3. – № 3. – P. 187-197.
207. Park, J. Y. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / J. Y. Park, M. H. Pillinger // Bull. NYU Hosp. Jt. Dis. – 2007. – Vol. 65. – P. 4-10.
208. Pepys, M. B. C-reactive protein: a critical update / M. B. Pepys, G. M. Hirschfield // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 111. – № 12. – P. 1805-1812.
209. Piotrovsky, L. B. Fullerenes and Viruses / L. B. Piotrovsky, O. I. Kiselev // Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures. – 2005. – Vol. 12. – № 1-2. – P. 397-403.

210. Poli-de-Figueiredo, L. F. Experimental models of sepsis and their clinical relevance / L. F. Poli-de-Figueiredo, A. G. Garrido, N. Nakagawa, P. Sannomiya // Shock. – 2008. – Vol. 30. – № 7. – P. 53–59.
211. Pool, R. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis / R. Pool, H. Gomez, J. A. Kellum // Crit. Care Clin. – 2018. – Vol. 34. – № 1. – P. 63–80.
212. Pormohammad, A. Nanomaterials in wound healing and infection control / A. Pormohammad, N. K. Monych, S. Ghosh [et al.] // Antibiotics (Basel). – 2021. – Vol. 10. – № 5. – P. 473.
213. Powers, C. J. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling / C. J. Powers, S. W. McLeskey, A. Wellstein // Endocr. Relat. Cancer. – 2000. – P. 165–197.
214. Pradhan, B. Comparative efficacy analysis of anti-microbial peptides, LL-37 and indolicidin upon conjugation with CNT, in human monocytes / B. Pradhan, D. Guha, K. C. Murmu [et al.] // J. Nanobiotechnology. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 44.
215. Preiser, J. C. Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effect in the dog / J. C. Preiser, D. Schmartz, P. Van der Linden [et al.] // Cytokine. – 1991. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–4.
216. Preshaw, P. M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents / P. M. Preshaw // Periodontol. 2000. – 2018. – Vol. 76. – № 1. – P. 131-149.
217. Raghuraman, H. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions / H. Raghuraman, A. Chattopadhyay // Biosci. Rep. – 2007. – Vol. 27. – № 4–5. – P. 189-223.
218. Rasskazova, N. D. Study of expression of hbd-1 and hbd-2 genes in epithelial cells of mucous upper airway in newborns with pneumonia depending on the causative agent / N. D. Rasskazova, A. I. Alieva, L. V. Gankovskaya [et al.] // RUDN J. Med. – 2018. – Vol. 22. – № 2. – P. 209-217.
219. Raugh, A. The amphiregulin/EGFR axis has limited contribution in controlling autoimmune diabetes / A. Raugh, Y. Jing, M. Bettini, M. Bettini // Sci. Rep. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 18653.

220. Regmi, S. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities, and future perspectives / S. Regmi, S. Pathak, J. O. Kim [et al.] // *Eur. J. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 98 – № 5–8. – P. 151041.
221. Rennekampff, H. O. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing / H. O. Rennekampff, J. F. Hansbrough, V. Kiessig [et al.] // *J. Surg. Res. Elsevier.* – 2000. – Vol. 93. – № 1. – P. 41-54.
222. Rice, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE / L. B. Rice // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 197. – № 8. – P. 1079-1081.
223. Rider, P. Biologics for targeting inflammatory cytokines, clinical uses, and limitations / P. Rider, Y. Carmi, I. Cohen // *Int. J. Cell Biol.* – 2016. – P. 1-11.
224. Robson, M. C. The role of growth factors in the healing of chronic wounds / M. C. Robson // *Wound Repair Regen.* – 1997. – Vol. 5. – № 1. – P. 12–17.
225. Rodriguez, A. Antimicrobial activity and structure of a consensus human β -defensin and its comparison to a novel putative hBD10 / A. Rodriguez, M. Ø. Pedersen, E. Villegas [et al.] // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2020. – Vol. 88. – № 1. – P. 175-186.
226. Romero, C. R. The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis / C. R. Romero, D. S. Herzig, A. Etogo [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2010. Vol. 88. – № 4. – P. 725–735.
227. Rosier, F. Transcriptional response in a sepsis mouse model reflects transcriptional response in sepsis patients / F. Rosier, N. F. Nuñez, M. Torres [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 821.
228. Rudd, K. E. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study / K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa [et al.] // *Lancet Lond. Engl.* – 2020. – Vol. 395. – № 10219. – P. 200-211.
229. Ruoff, R. S. Solubility of fullerene (C60) in a variety of solvents / R. S. Ruoff, D. S. Tse, R. Malhotra [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 1993. – Vol. 97. – № 13. – P. 3379-3383.

230. Ryan, J. J. Fullerene Nanomaterials Inhibit the Allergic Response / J. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – № 1. – P. 665-672.
231. Saber, S. Nanoscale systems for local activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha: a new approach in diabetic wound management / S. Saber, R. Abdelhady, M. Elhemely [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2024. – Vol. 19. – P. 13735–13762.
232. Salkowski, C. A. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration / C. A. Salkowski, G. Detore, A. Franks [et al.] // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. – № 8. – P. 3569–3578.
233. Sa-NGasang, A. Association of IL1B -31C/T and IL1RA Variable number of an 86-bp tandem repeat with dengue shock syndrome in Thailand / A. Sa-NGasang, J. Ohashi, I. Naka [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 210. – № 1. – P. 138–145.
234. Sarkar, T. Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond / T. Sarkar, M. Chetia, S. Chatterjee // *Front. Chem.* – 2021. – Vol. 9. – P. 691532.
235. Schulte, W. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view / W. Schulte, J. Bernhagen, R. Bucala // *Mediators Inflamm.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 165974.
236. Schultz, G. S. Principles of wound healing / G. S. Schultz, G. A. Chin, L. Moldawer, R. F. Diegelmann // *Mechanisms of vascular disease: a reference book for vascular specialists* / ed. R. Fitridge, M. Thompson. – Adelaide (AU): University of Adelaide Press, 2011. – Chapter 23. – P. 423-450.
237. Semenza, G. L. Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery / G. L. Semenza // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 301. – № 3. – P. 550–552.
238. Seo, J.-K. Antimicrobial activity and action mechanisms of Arg-rich short analog peptides designed from the C-terminal loop region of american oyster defensin (AOD) / J.-K. Seo, D.-G. Kim, J.-E. Lee [et al.] // *Mar. Drugs.* – 2021. – Vol. 19. – № 8. – P. 451.

239. Seok, J. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases / J. Seok, H. Warren, A. Cuenca [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2013. – Vol. 110. – № 9. – P. 3507–3512.
240. Seto, G. W. J. Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies / G. W. J. Seto, S. Marwaha, D. M. Kobewka [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* – 2007. – Vol. 1768. – № 11. – P. 2787-2800.
241. Shen, C. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing / C. Shen, L. Sun, N. Zhu, F. Qi // *Int. J. Mol. Med.* – 2017. – Vol. 39. – № 4. – P. 949–959.
242. Sherri, N. Epstein-Barr virus DNA enhances dipterocin expression and increases hemocyte numbers in *Drosophila melanogaster* via the immune deficiency pathway / N. Sherri, N. Salloum, C. Mouawad [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1268.
243. Shershakova, N. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis / N. Shershakova, E. Baraboshkina, S. Andreev [et al.] // *J. Nanobiotechnology.* – 2016. – Vol. 14. – № 1. – P. 8.
244. Shershakova, N. N. Aqueous fullerene c60 dispersion reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice / N. N. Shershakova, E. N. Baraboshkina, D. D. Shabanova [et al.] // *Allergy.* – 2017. – № 72. – P. 477.
245. Shershakova, N. N. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by “green technology” / N. N. Shershakova, S. M. Andreev, A. A. Tomchuk [et al.] // *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* – 2023. – Vol. 47. – № 102619. – P. 1-15.
246. Shi, J. *Acinetobacter baumannii*: an evolving and cunning opponent / J. Shi, J. Cheng, S. Liu [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2024. – Vol. 15. – 1332108.
247. Silva, A. R. P. Recent advances in the design of antimicrobial peptide conjugates / A. R. P. Silva, M. S. Guimarães, J. Rabelo [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2022. – Vol. 10. – № 19. – P. 3587-3600.

248. Simmaco, M. Temporins, antimicrobial peptides from the european red frog *Rana temporaria* / M. Simmaco, G. Mignogna, S. Canofeni [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1996. – Vol. 242. – № 3. – P. 788-792.
249. Singampalli, K. L. The role of an IL-10/hyaluronan axis in dermal wound healing / K. L. Singampalli, S. Balaji, X. Wang [et al.] // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 636.
250. Sochacki, K. A. Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37 / K. A. Sochacki, K. J. Barns, R. Bucki, J. C. Weisshaar // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 108. – № 16. – P. E77-81.
251. Song, P. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2 / P. Song, W. Li, J. Xie [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2020. – Vol. 509. – P. 280-287.
252. Stortz, J. A. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? / J. A. Stortz, S. L. Raymond, C. M. Juan [et al.] // *ILAR J.* – 2017. – Vol. 58. – № 1. – P. 90-105.
253. Stortz, J. Old mice demonstrate organ dysfunction as well as prolonged inflammation, immunosuppression, and weight loss in a modified surgical sepsis model / J. Stortz, M. Hollen, D. Nacionales [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2019. – Vol. 47. – № 11. – P. 919-929.
254. Sullivan, G. W. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A2A receptor agonists / G. W. Sullivan, J. M. Rieger, W. Scheld [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 132. – № 5. – P. 1017-1026.
255. Sun, B. Acute lung injury caused by sepsis: how does it happen? / B. Sun, M. Lei, J. Zhang [et al.] // *Front. Med.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1289194.
256. Sur, A. Immune activation efficacy of indolicidin is enhanced upon conjugation with carbon nanotubes and gold nanoparticles / A. Sur, B. Pradhan, A. Banerjee, P. Aich // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. e0123905.
257. Suzuma, K. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells K. Suzuma, H.

- Takagi, A. Otani, Y. Honda // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* –1998. – Vol. 39. – № 6. – P. 1028–1035.
258. Takahashi, D. Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity / D. Takahashi, S. K. Shukla, O. Prakash // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92. – № 9. – P. 1236-1241.
259. Takao, K. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases / K. Takao, T. Miyakawa // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 112. – № 4. – P. 1167–1172.
260. Tam, C. Cytokeratins mediate epithelial innate defense through their antimicrobial properties / C. Tam, J. J. Mun, D. J. Evans, S. M. Fleiszig // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122. – № 10. – P. 3665-3677.
261. Tamama, K. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition / K. Tamama, H. Kawasaki, S. S Kerpedjieva [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2011. – Vol. 112. – № 3. – P. 804–817.
262. Tandara, A. A. Oxygen in Wound Healing—More than a Nutrient / A. A. Tandara, T. A. Mustoe // *World J. Surg.* – 2004. – Vol. 28. – № 3. – P. 294–300.
263. Thapa, R. K. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects / R. K. Thapa, D. B. Diep, H. H. Tønnesen // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 103. – P. 52-67.
264. Torres, A. M. Structure and antimicrobial activity of platypus “intermediate” defensin-like peptide / A. M. Torres, P. Bansal, J. M. Koh [et al.] // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 588. – № 9. – P. 1821-1826.
265. Tran, D. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins / D. Tran, P. Tran, K. Roberts [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – № 3. – P. 944-953.
266. Tsai, Y. Leveraging hypotension prediction index to forecast LPS-induced acute lung injury and inflammation in a porcine model: exploring the role of hypoxia-inducible factor in circulatory shock / Y. Tsai, Y. Lin, C. Chen [et al.] // *Biomedicines.* – 2024. – Vol. 12. – № 8. – P. 1665.

267. Tsao, N. Inhibition of group a streptococcus infection by carboxyfullerene / N. Tsao, T. Y. Luh, C. K. Chou [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – № 6. – P. 1788-1793.
268. Tsuchiya, T. Novel harmful effects of [60] fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo / T. Tsuchiya, I. Oguri, Y. N. Yamakoshi, N. Miyata // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 393. – № 1. – P. 139-145.
269. Turillazzi, S. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap / S. Turillazzi, G. Mastrobuoni, F. R. Dani [et al.] // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* – 2006. – Vol. 17. – № 3. – P. 376-83.
270. Tyavambiza, C. Cellular and molecular events of wound healing and the potential of silver based nanoformulations as wound healing agents / C. Tyavambiza, M. Meyer, S. Meyer // *Bioeng. Basel Switz.* – 2022. – Vol. 9. – № 11. – P. 712.
271. Van Epps, H. L. René Dubos: unearthing antibiotics / H. L. Van Epps // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – № 2. – P. 259-259.
272. Van Lier, D. Experimental human endotoxemia as a model of systemic inflammation / D. van Lier, C. Geven, G. P Leijte, P. Pickkers // *Biochimie.* – 2019. – Vol. 159. – P. 99-106.
273. Vavilova, T. P. Antimicrobial peptides — the multifunctional protection of the tissues of the oral cavity / T. P. Vavilova, N. I. Derkacheva, I. G. Ostrovskaya // *Rossiiskaya stomatologiya.* – 2015. – Vol. 8. – № 3. – P. 3.
274. Vilenko, B. In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60 / B. Vilenko, A. Sienkiewicz, M. Lekka [et al.] // *Carbon.* – 2004. – Vol. 42. – № 5–6. – P. 1195-1198.
275. Villar-Fincheira, P. Role of interleukin-6 in vascular health and disease / P. Villar-Fincheira, F. Sanhueza-Olivares, I. Norambuena-Soto [et al.] // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 641–734.

276. Vincent, J.-L. Frequency and mortality of septic shock in Europe and North America: a systematic review and meta-analysis / J.-L. Vincent, G. Jones, S. David [et al.] // *Crit. Care Lond. Engl.* – 2019. – Vol. 23. – № 1. – P. 196.
277. Vivas, M. Plasma interleukin-6 levels correlate with survival in patients with bacterial sepsis and septic shock / M. Vivas, H. Guerrero, A. Tascon [et al.] // *Interv. Med. Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – № 4. – P. 224–230.
278. Volman, T. Tissue- and time-dependent upregulation of cytokine mRNA in a murine model for the multiple organ dysfunction syndrome / T. Volman, R. Goris, J. van der Meer, T. Hendriks // *Ann. Surg.* – 2004. – Vol. 240. – № 1. – P. 142–150.
279. Vuong, C. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system / C. Vuong, J. M. Voyich, E. R. Fischer [et al.] // *Cell. Microbiol.* – 2004. – Vol. 6. – № 3. – P. 269–275.
280. Wang, F. Alarmin human α defensin HNP1 activates plasmacytoid dendritic cells by triggering NF- κ B and IRF1 signaling pathways / F. Wang, L. Qiao, X. Lv [et al.] // *Cytokine.* – 2016. – Vol. 83. – P. 53–60.
281. Wang, G. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education / G. Wang, X. Li, Z. Wang // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – № D1. – P. D1087–D1093.
282. Wang, I. C. C60 and water-soluble fullerene derivatives as antioxidants against radical-initiated lipid peroxidation / I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42. – № 22. – P. 4614–4620.
283. Wang, J. Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era / J. Wang, X. Dou, J. Song [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2019. – Vol. 39. – № 3. – P. 831–859.
284. Wang, L.-T. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials / L.-T. Wang, C.-H. Ting, M.-L. Yen [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 76.

285. Wang, X. Analyzing mechanisms of action of antimicrobial peptides on bacterial membranes requires multiple complimentary assays and different bacterial strains / X. Wang, R. A. M. van Beekveld, Y. Xu [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2023. – Vol. 1865. – № 6. – P. 184160.
286. Wangoo, A. Interleukin-10- and corticosteroid-induced reduction in type I procollagen in a human ex vivo scar culture / A. Wangoo, C. Laban, H. T. Cook [et al.] // *Int. J. Exp. Pathol.* – 1997. – Vol. 78. – № 1. – P. 33–41.
287. Watanabe, Y. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells / Y. Watanabe, S. W. Lee, M. Detmar [et al.] // *Oncogene.* – 1997. – Vol. 14. – № 17. – P. 2025–2032.
288. Wicki, A. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications / A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler // *J. Controlled Release.* – 2015. – Vol. 200. – P. 138-157.
289. Wong, W. J. Hypoxia-inducible factors regulate filaggrin expression and epidermal barrier function / W. J. Wong, T. Richardson, J. T. Seykora [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2015. – Vol. 135. – № 2. – P. 454–461.
290. Wu, D. D. Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications / D. D. Wu, T. Li, X. Y. Ji // *J. Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–9.
291. Wu, H. A2A adenosine receptor activation improves survival in mouse models of endotoxemia and sepsis / H. Wu, C. Wu, C. Chen [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 189. – № 10. – P. 1897–1904.
292. Wu, H. The interleukin-4 expression in patients with severe sepsis / H. Wu, C. Wu, C. Chen [et al.] // *J. Crit. Care.* – 2008. – Vol. 23. – № 4. – P. 519–524.
293. Xie, L. X. New Biomarkers for Sepsis / L. X. Xie // *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army.* – 2013. – Vol. 38. – № 1. – P. 6-9.
294. Yamamoto, T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1

- alpha loop / T. Yamamoto, B. Eckes, C. Mauch [et al.] // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164. – № 12. – P. 6174-6179.
295. Yang, L. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores / L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss [et al.] // Biophys. J. – 2001. – Vol. 81. – № 3. – P. 1475-1485.
296. Yang, X. L. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C60]fullerene derivatives and its mechanism / X. L. Yang, C. H. Fan, H. S. Zhu // Toxicol. In Vitro. – 2002. – Vol. 16. – № 1. – P. 41-46.
297. Yeaman, M. R. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action / M. R. Yeaman, A. S. Bayer, S. P. Koo [et al.] // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 101. – № 1. – P. 178-187.
298. Yfantis, A. Transcriptional response to hypoxia: the role of HIF-1-associated co-regulators / A. Yfantis, I. Mylonis, G. Chachami [et al.] // Cells. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 798.
299. Yu, G. Combination Effects of Antimicrobial Peptides / G. Yu, D. Y. Baeder, R. R. Regoes, J. Rolff // Antimicrob. Agents Chemother. – 2016. – Vol. 60. – № 3. – P. 1717-1724.
300. Yudoh, K. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis / K. Yudoh, R. Karasawa, K. Masuko, T. Kato // Int. J. Nanomedicine. – 2009. – P. 217.
301. Yurkova, M. S. Dimerization of Antimicrobial Peptide Polyphemusin I into One Polypeptide Chain: Theoretical and Practical Consequences / M. S. Yurkova, V. A. Zenin, E. G. Sadykhov, A. N. Fedorov // Appl. Biochem. Microbiol. – 2020. – Vol. 56. – № 9. – P. 893-897.
302. Yusuf, K. The Role of TNF-Alpha in the Wound Healing Process: Molecular and Clinical Perspectives – A Systematic Literature Review / K. Yusuf // J. RSMH Plb. – 2024. – Vol. 3. – № 2. – P. 222-228.

303. Zhang, Q. Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing / Q. Zhang, S. O'Hearn, S. L. Kavalukas, A. Barbul // *J. Surg. Res.* – 2012. – Vol. 176. – № 1. – P. 343–347.
304. Zhang, T. The immunomodulatory function of adenosine in sepsis / T. Zhang, L. Yu-Jing, T. Ma // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 936547.
305. Zhen, M. HMGB1 Accelerates Wound Healing by Promoting the Differentiation of Epidermal Stem Cells via the “HMGB1-TLR4-Wnt/Notch” Axis / M. Zhen, Y. Zhu, P. Wang, X. Liu // *Adv. Wound Care.* – 2024. – P. 130.
306. Zhou, J. Antimicrobial activity of the antibacterial peptide PMAP-36 and its analogues / J. Zhou, Y. Liu, T. Shen [et al.] // *Microb. Pathog.* – 2019. – Vol. 136. – P. 103712.
307. Zhou, Y. Biocompatible [60]/[70] Fullerenols: Potent Defense against Oxidative Injury Induced by Reduplicative Chemotherapy / Y. Zhou, J. Li, H. Ma [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – Vol. 9. – № 41. – P. 35539-35547.
308. Zhu, S. Endogenous regulation and pharmacological modulation of sepsis-induced HMGB1 release and action: an updated review cassie / S. Zhu, W. Wang, X. Qiang [et al.] // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – № 9. – P. 2220.