

На правах рукописи

ГАЛКИНА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

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

3.2.7. Иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель:

доктор биологических наук **Шершакова Надежда Николаевна**

Официальные оппоненты:

Гребенникова Татьяна Владимировна – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Института вирусологии им. Д. И. Ивановского, руководитель испытательного центра, руководитель лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Анисимова Наталья Юрьевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте:

<https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-совет/zashchity-dissertatsiy/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Шиловский Игорь Петрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [E. R. Brannon et al., 2022]. 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 [E. V. Ковалева и др., 2025; N. Shershakova et al., 2016; K. Yudoh et al., 2009]. Показана способность водной дисперсии фуллерена C₆₀ подавлять развитие воспаления *in vivo* и эффективность в качестве сопутствующей терапии для заживления ран [N. N. Shershakova et al., 2023].

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, №4, №5, №6).

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 [I. S. Wang et al., 1999], антибактериальной [N. Tsao et al., 2001], мембранотропной [I. M. Andreev et al., 2002], противовирусной [R. Klimova et al., 2020; Y. L. Lin et al., 2000;], противоопухолевой [X. L. Yang et al., 2002], нейропротекторной [L. L. Dugan et al., 2001] и фотодинамической [B. Vilenov et al., 2004]. Отмечаются перспективы использования водного раствора фуллерена C₆₀ в качестве противовоспалительного

средства [N. Shershakova et al., 2016; N. N. Shershakova et al., 2023]. 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 [N. N. Shershakova et al., 2023]. Также на базе института осуществляются разработка и получение производных фуллерена C₆₀ с аминокислотами и пептидами [I. Andreev et al., 2008], 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 [L. Cresti et al., 2024], чему способствовала пандемия COVID-19. На момент 2022 года было зарегистрировано около 70 пептидных препаратов (14 зарегистрировано в России) [V. I. Deigin et al., 2022], 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 водного раствора фуллерена (ВРФ) C₆₀ 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 проведённого 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.

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.

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.

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 ИМАС-21 (Москва, Российская Федерация, 2-3 декабря 2021 г.) и ИМАС-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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение синтетических КП: все пептиды получали твердофазным методом по протоколу Fmoc и очищали методом препаративной ВЭЖХ-хроматографии.

Получение комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и КП осуществляли двумя способами: посредством конъюгирования платформы C₆₀(Lys-MPA)_n, где n – число остатков Lys-MPA, с синтетическими КП, а также посредством смешивания ВРФ и растворов синтетических КП в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Анализ антибактериальной активности: 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 комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и КП 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 патогенных штаммов *E. coli* (4S, 4SI, 4SR), а также видов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *A. baumannii*, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

Оценка бактерицидной активности основывалась на расчете минимальной бактерицидной концентрации (МБК), за которую принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую гибель 99,9 % микроорганизмов.

Оценку цитотоксичности КП и комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и КП проводили с помощью МТТ-теста.

Животные: для моделирования патологических состояний человека 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).

Моделирование LPS-индуцированного шока *in vivo* проводили для последующей оценки способности комбинированных соединений фуллерена C60 и КП подавлять развитие воспалительного ответа. Для моделирования состояния летального эндотоксического шока животным внутрибрюшинно вводили 80 мкг LPS (*E. coli* K-235). За 24 часа и за 1 час до введения LPS мышам вводили ВРФ (группа «ВРФ») и растворы комплексных соединений K14, K17 и K18 (группы «K14», «K17» и «K18», соответственно) в вышеупомянутых дозах. Через час после введения LPS осуществляли забор легких, почек и печени.

Моделирование раневого поражения кожи *in vivo* проводили под анестезией. Для изучения способности КП оказывать влияние на ранозаживляющую активность фуллерена C60, на раны ежедневно в течение 11 дней наносили мазь, содержащую водную дисперсию фуллерена C60 (группа «ВРФ»), раствор катионного пептида, комбинированного соединения на основе катионного пептида и фуллерена C60 или PBS (группа «Модель»). Для эксперимента были выбраны гибридные соединения ASM-45 и ASM-46, полученные на основе пептидов KK-46 и ST-10, соответственно, а также комплексы K14, K17 и K18 на основе АВ-14, АВ-17 и АВ-18, соответственно. Забор фрагмента кожи в области раны осуществляли на 12-й (ASM-45 и ASM-46) или 11-й (K14, K17 и K18) день эксперимента.

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) [В. Молчанова и др., 2012; N. N. Shershakova et al., 2023]. Результаты выражали в мм² и процентах от исходной площади, проводя расчёты индивидуально для каждого животного.

ПЦР-РВ: из тканей лёгких, почек, печени или кожи мышей экстрагировали матричную РНК для дальнейшего определения уровня экспрессии исследуемых генов.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный скрининг КП на наличие антибактериальной активности был проведен с использованием неинфекционного (без O-антигена) лабораторного штамма *E. coli* Dh5 α . Ориентируясь на полученные значения МБК, из 35 синтезированных пептидов для дальнейших экспериментов были отобраны небольшие, легко синтезируемые молекулы с наиболее выраженной бактерицидной активностью: КК-46 (МБК 0,1566 mM), ПД (МБК 0,1566 mM), ST-10 (МБК 0,7740 mM), А-69 (МБК 1,1670 mM), АВ-4 (МБК 0,4620 mM), АВ-14 (МБК 0,0063 mM), АВ-17 (МБК 0,1517 mM) и АВ-18 (МБК 0,0245 mM) (рисунок 1). МБК контрольного антибиотика ампициллина составила 0,2685 mM.

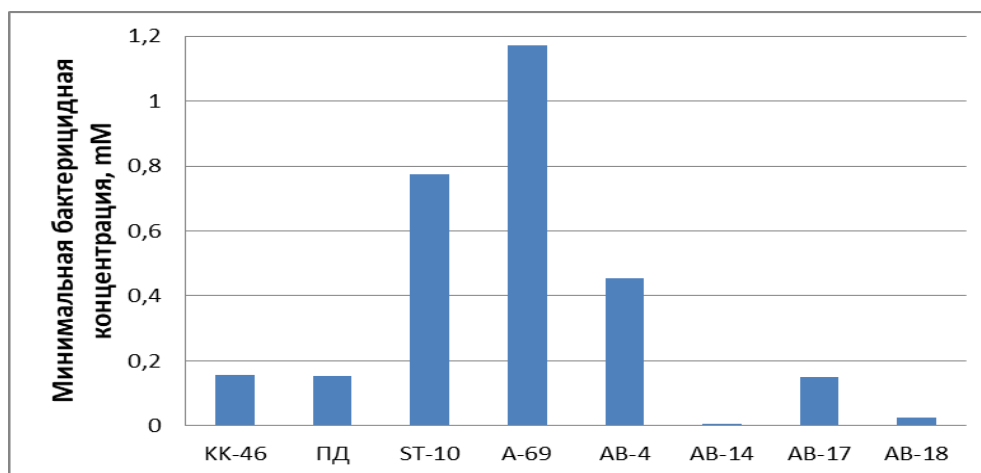


Рисунок 1 – Сравнительный анализ бактерицидной активности наиболее эффективных катионных пептидов КК-46, ПД, ST-10, А-69, АВ-4, АВ-14, АВ-17, АВ-18 в отношении *E. coli* Dh5 α . Общее микробное число: $5,4 \cdot 10^3$ КОЕ/мл

Поскольку наибольшую бактерицидную активность проявили К14, К17, К18, мы решили изучить их активность на примере штаммов микроорганизмов с различным строением клеточной стенки и устойчивых к антибиотикам (рисунок 2).

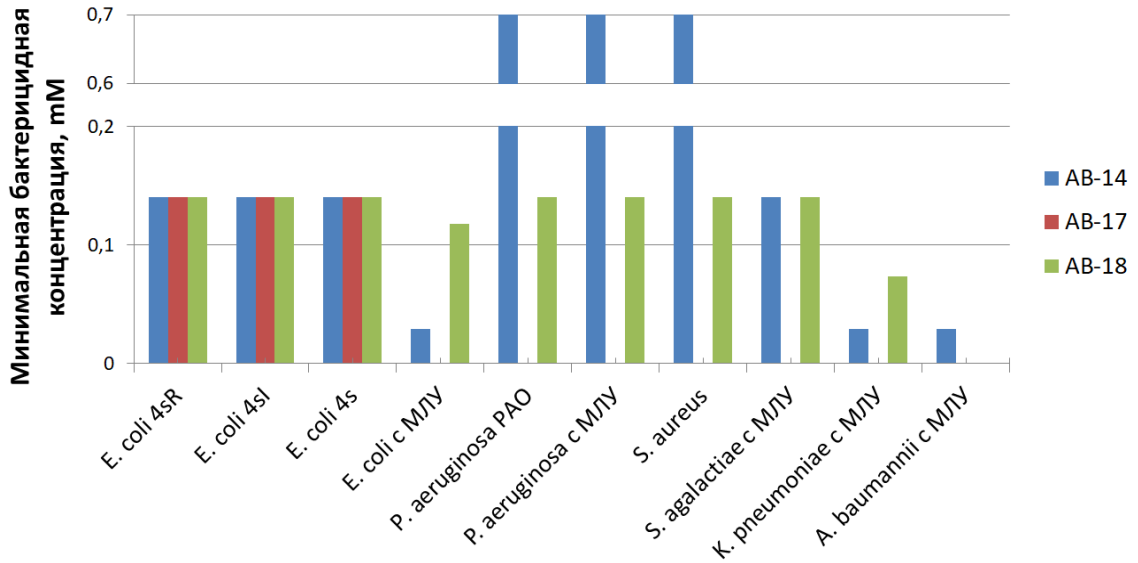


Рисунок 2 – Антибактериальная активность катионных пептидов АВ-14, АВ-17, АВ-18 в отношении клинически значимых видов бактерий. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Как следует из данных, показанных на графике, АВ-14 и АВ-18 демонстрируют выраженную спектроспецифичность, зависящую от вида бактериального патогена и наличием у него фенотипа МЛУ. Наибольший потенциал АВ-14 был выявлен в отношении грамотрицательных МЛУ-патогенов, в то время как пептид АВ-18 был наиболее активен против *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Различие между АВ-14 и АВ-18 заключается в профиле их МБК: 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, что повышает его перспективность как агента широкого спектра действия для терапии смешанных инфекций. Напротив, значительная вариабельность МБК АВ-14 указывает на высокоспецифичное действие, эффективное против определенных грамотрицательных МЛУ-патогенов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*), но менее эффективное против других видов бактерий из-за их барьерных механизмов.

Далее, на основе КП с наиболее выраженной бактерицидной активностью в отношении лабораторного штамма кишечной палочки были разработаны комбинированные соединения с фуллереном C60. В результате оценки бактерицидной активности комбинированных соединений в отношении *E. coli* Dh5a

было установлено, что КП сохраняют свою антибактериальную активность в составе конъюгатов и комплексов с фуллереном C60 (рисунок 3).

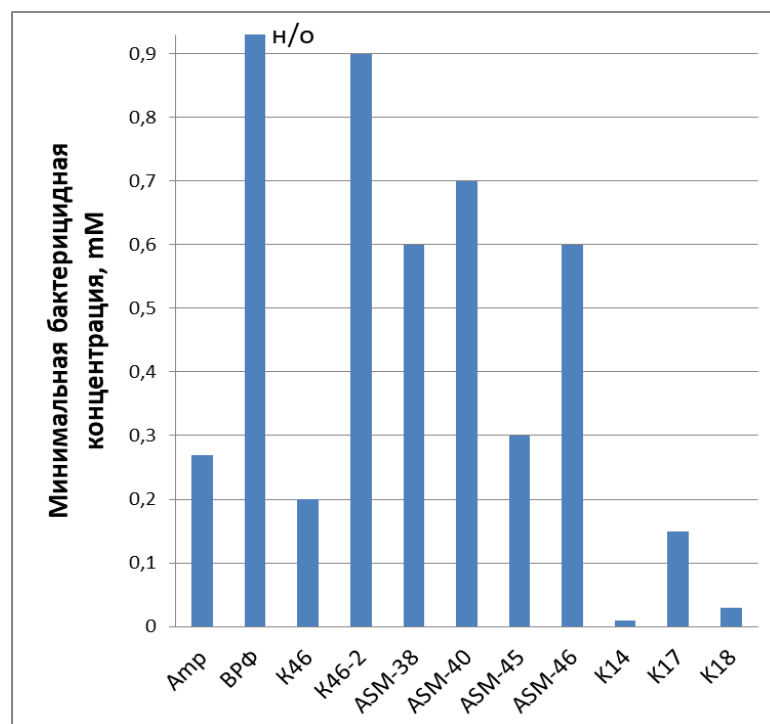


Рисунок 3 – Интенсивность роста колоний *E. coli* Dh5α в присутствии конъюгатов и комплексов на основе катионных пептидов и фуллерена C60 с выявленной антибактериальной активностью. «Amp» – антибиотик ампициллин; «ВРФ» – водный раствор фуллерена C60; «н/о» – не определяется

МБК составили: 0,3018 mM и 0,6033 mM для ASM-45 и ASM-46, соответственно (конъюгаты на основе КК-46 и ST-10, соответственно), 0,1508 mM для К17 (комплекс на основе АВ-17) и 0,0070 mM и 0,290 mM для К14 и К18, соответственно (комплексы на основе АВ-14 и АВ-18, соответственно). Выявлено, что данные пептиды были нетоксичны для клеток млекопитающих в диапазоне концентраций 20-174 мкг/мл. Наиболее перспективные комбинированные соединения, показавшие выраженную антибактериальную активность в рамках первичного скрининга, а именно К14, К17 и К18, были отобраны для последующего изучения на примере микроорганизмов других штаммов и видов.

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о том, что синтетические антимикробные пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18 преимущественно сохраняли выраженную антибактериальную активность в составе комплексов с фуллереном C60 (МБК преимущественно составляла 0,14 mM) (рисунок 4).

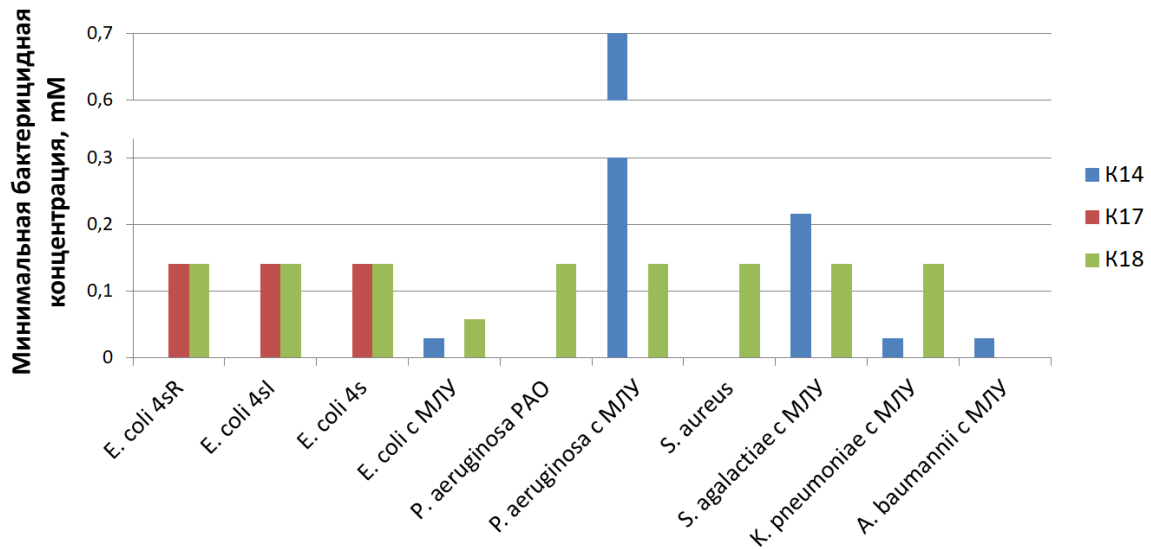


Рисунок 4 – Антибактериальная активность комплексов K14, K17, K18 в отношении клинически значимых видов бактерий. МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

Характерной особенностью комплексов K14 и K18 являлось то, что они были способны подавлять рост как грам-положительных, так и грам-отрицательных микроорганизмов. 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 на модели состояния эндотоксического шока *in vivo*.

Показано, что введение LPS в дозе 80 мкг/мышь (группа «Модель») приводило к гибели 100 % животных уже через 24 часа после инъекции. Профилактическое введение исследуемых препаратов приводило к значительному повышению выживаемости. В группе животных, получавших ВРФ и K14, процент выживаемости составлял 87,5 % и 75,0 %, соответственно. Выживаемость же в группах «K17», «K18» и «Дексаметазон» (положительный контроль) составила 100 %.

Далее было установлено, 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-κB-зависимого механизма в модулирующее действие фуллерена C60 на синтез цитокинов.

Эндотоксический шок, как известно, сопровождается дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. В частности, соотношение уровня экспрессии *Il1rn* к уровню экспрессии *Il1b* уже через 1 час после введения LPS может служить ранним прогностическим маркером, поскольку отражает развитие ранних компенсаторных механизмов при моделировании системного воспаления. В данном исследовании 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 (рисунок 5).

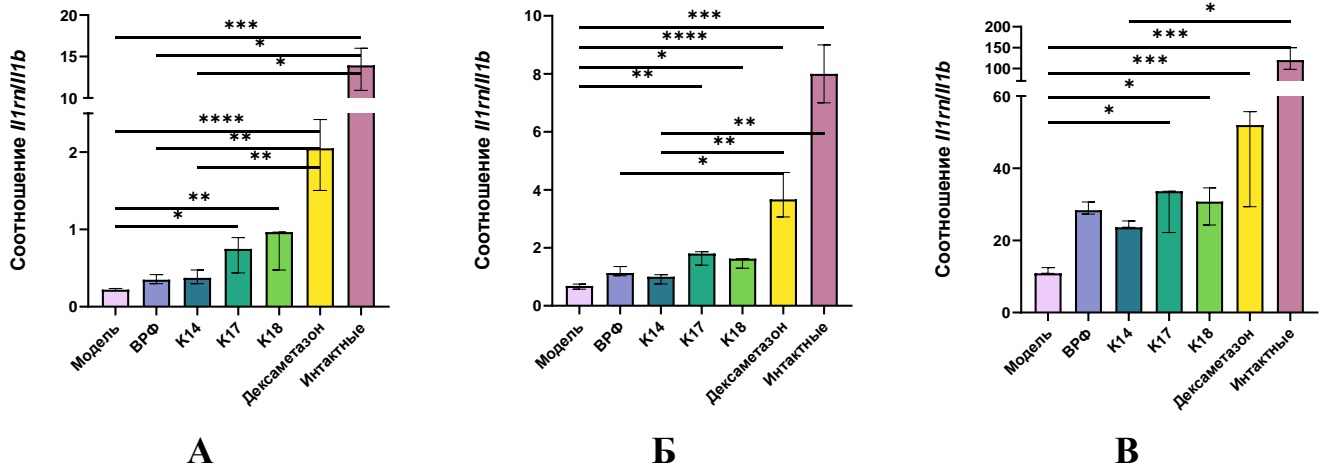


Рисунок 5 – Соотношение *Il1rn/Il1b*, определенное для легочной (А), почечной (Б) и печеночной (В) ткани мышей через час после внутрибрюшинного введения LPS (медиана ± интерквартильный размах; n = 8). Примечание: * - p < 0,05; ** - p < 0,01; *** - p < 0,001; **** - p < 0,0001

Важно отметить, что выживаемость групп, получавших К17 и К18, была выше, чем в группе, получавшей фуллерен C60 без пептида (группа «ВРФ»). Следовательно, фуллерен C60 и катионные пептиды АВ-17 и АВ-18 демонстрировали синергичное действие в составе комбинированных соединений К17 и К18, соответственно, при подавлении системного воспалительного ответа.

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 комбинированных соединений ASM-45 и ASM-46, К14 и К18 (рисунок 6А).

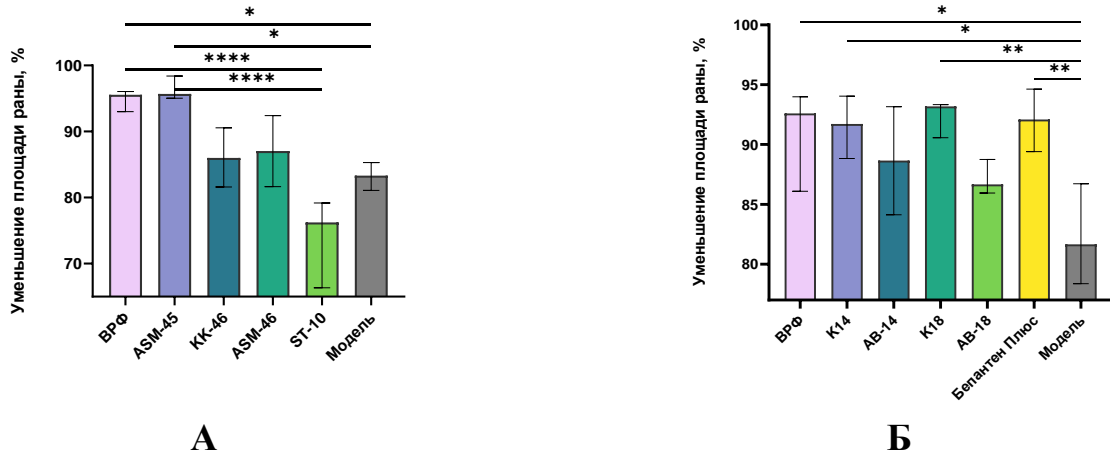


Рисунок 6 – Ранозаживляющая эффективность препаратов на 12-й (А) и 11-й (Б) день после моделирования раневого поражения кожи *in vivo* (медиана \pm интерквартильный размах; $n = 8$). Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,0001$

В ходе эксперимента было показано, что конъюгат на основе фуллерена C60 и катионного пептида KK-46 (ASM-45) ускорял процесс ранозаживления на уровне ВРФ, в то время как сам пептид KK-46 не обладал ранозаживляющей активностью. Напротив, терапия пептидом ST-10, входящим в состав конъюгата ASM-46, приводила к замедлению процесса ранозаживления у мышей, что, вероятно, было связано со структурными особенностями пептида.

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 (рисунок 6Б).

В ходе визуальной оценки было выявлено, что в группах, где животные получали на кожу ВРФ или комплексы K14 и K18, процесс заживления ран шел интенсивнее относительно контрольной группы («PBS»).

Показано, что комплексы фуллерена C60 и КП подавляли экспрессию генов провоспалительных цитокинов (*Tnfa*, *Il6*, *Il1a* и *Il1b*) и стимулировали экспрессию генов, отвечающих за заживление тканей без рубцов (*Il10* и *Tgfb1*). Выявлено, что терапия мазью на основе ВРФ, K14 и K18 ускоряла процесс ангиогенеза и восстановления баланса кислорода в микроокружении раны: уровень экспрессии *Hif1a* снижался на 11-й день после поражения кожи, вследствие чего наблюдалось снижение уровней экспрессии генов факторов, участвующих в процессе ангиогенеза (*Vegfa*, *Fgfb* и *Egf*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги. 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 филаггрина 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи:

1. **Галкина, А. А.** Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена / А. А. Галкина, Д. К. Болякина, А. В. Шатилова, А. А. Шатилов, М. О. Бабихина, А. К. Голомидова, С. М. Андреев, Н. Н. Шершакова, М. Р. Хаитов. – Текст : непосредственный // Медицина экстремальных ситуаций. – 2023. – № 3. – С. 56-64. (категория К2; Q4 по SJR)

2. **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, А. А. Шатилов, М. О. Бабихина, А. К. Голомидова, А. А. Никонова, С. М. Андреев, Д. А. Кудлай, Н. Н. Шершакова, М. Р. Хаитов. – Текст : непосредственный // Российский Аллергологический Журнал. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 387-401. (категория К2; Q4 по SJR)

3. **Петрова, Н. В.** Антианафилактические эффекты технологически обработанных антител к МНС II / Н. В. Петрова, С. А. Тарасов, А. А. Галкина, А. С. Порошина, М. С. Сундукова, В. В. Смирнов. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175, № 6. – С. 801-803. (категория К1; Q3 по SJR)

4. **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, В. А. Шангараева, Д. С. Горшенин, Е. Н. Барабошкина, А. А. Галкина, Д. К. Болякина, В. А. Паршина, Р. А. Курмашева, Н. Н. Шершакова, Л. В. Михина, М. Р. Хаитов. – Текст : непосредственный // Российский Аллергологический Журнал. – 2025. – Т. 22, № 2. – С. 153-164. (категория К2; Q4 по SJR)

5. **Галкина, А. А.** Создание ранозаживляющих препаратов на основе антибактериальных катионных пептидов и фуллерена C60 / А. А. Галкина, Н. Н. Шершакова, М. В. Ходжава, Д. К. Болякина, А. К. Голомидова, О. О. Колоскова, Д. С. Горшенин, С. М. Андреев, Г. О. Гудима, Д. А. Кудлай, М. Р. Хаитов. – Текст : непосредственный // Иммунология. – 2025. – Т. 46, № 3. – С. 289–300. (категория K1; Q4 по SJR)

Патенты:

1. **Патент № 2837372 Российская Федерация, МПК А61К 38/00 (2006.01), А61К 38/10 (2006.01), А61К 38/16 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01).**

Пептиды, обладающие антибактериальной активностью : № 2024110651 : заявл. 18.04.2024 : опубл. 31.03.2025 / Шершакова Н. Н., Андреев С. М., Шатилов А. А., Шатилова А. В., Галкина А. А., Хаитов М. Р. – Текст : непосредственный.

2. **Патент № 2841633 Российская Федерация, МПК А61К 38/10 (2006.01), А61К 38/16 (2006.01), А61К 47/52 (2017.01), А61Р 31/04 (2006.01).**

Гибридные соединения на основе фуллерена C60 и катионных пептидов в качестве противомикробного средства (варианты) : № 2024114964 : заявл. 31.05.2024 : опубл. 11.06.2025 / Шершакова Н. Н., Андреев С. М., Шатилов А. А., Шатилова А. В., Галкина А. А., Турецкий Е. А., Хаитов М. Р. – Текст : непосредственный.

3. **Патент № 2841634 Российская Федерация, МПК А61К 38/10 (2006.01), А61К 38/16 (2006.01), А61К 47/52 (2017.01), А61Р 31/04 (2006.01).**

Гибридные соединения на основе фуллерене C60 и катионных пептидов в качестве противомикробного средства : № 2024114964 : заявл. 31.05.2024 : опубл. 11.06.2025 / Шершакова Н. Н., Андреев С. М., Шатилов А. А., Шатилова А. В., Галкина А. А., Турецкий Е. А., Хаитов М. Р. – Текст : непосредственный.

Публикации в материалах научных конгрессов и конференций:

1. **Galkina, A. A.** Fullerene C60 and its derivatives: study of the toxic effect / A. A. Galkina, N. N. Shershakova, S. M. Andreev, E. A. Turetskiy, M. R. Khaitov. – Текст : непосредственный // Allergy : Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress (Krakow, Poland and Madrid, Spain, 10-12 July 2021). – 2021. – Vol. 76, No. S110. – Текст англ.

2. **Bolyakina, D. K.** Study of the fullerene C60 interaction with aryl-hydrocarbon receptor / D. K. Bolyakina, A. A. Galkina, S. M. Andreev, E. A. Turetskiy, N. N.

Shershakova, M. R. Khaitov. – Текст : электронный // Вестник аллерголога-иммунолога : тезисы докладов международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-21 (Москва, Российская Федерация, 2-3 декабря 2021 г.). – 2021. – URL: <https://allergovestnik.ru/study-of-the-fullerene-c60-interaction-with-aryl-hydrocarbon-receptor> (Дата обращения: 11.03.2025). – Текст англ.

3. **Галкина, А. А.** Синтез и сравнительная оценка антимикробной активности катионных пептидов / А. А. Галкина, Д. К. Болякина, А. Б. Третьякова, А. В. Шатилова, А. А. Шатилов, М. О. Бабихина, А. К. Голомидова, С. М. Андреев, Н. Н. Шершакова, М. Р. Хаитов. – Текст : электронный // Вестник аллерголога-иммунолога : тезисы докладов международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-22 (Москва, Российская Федерация, 1-2 декабря 2022 г.). – 2022. – URL: <https://allergovestnik.ru/sintez-i-sravnitel'naya-ocenka-antimikrobnaj-aktivnosti-kationnyh-peptidov> (Дата обращения: 11.03.2025)

4. **Болякина, Д. К.** Анализ взаимодействия фуллерена С60 с арил-углеводородным рецептором в качестве возможной биологической мишени / Д. К. Болякина, А. А. Галкина, С. М. Андреев, Е. А. Турецкий, Н. Н. Шершакова, М. Р. Хаитов. – Текст : электронный // Вестник аллерголога-иммунолога : тезисы докладов международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-22 (Москва, Российская Федерация, 1-2 декабря 2022 г.). – 2022. – URL: <https://allergovestnik.ru/analiz-vzaimodejstviya-fullerena-c60-s-aril-uglevodorodnym-receptorom-v-kachestve-vozmozhnoj-biologicheskoy-misheni> (Дата обращения: 11.03.2025)

5. **Бабихина, М. О.** Получение нового полиаргининового дендримерного пептида и исследование его противомикробной и трансфекционной активности / М. О. Бабихина, А. А. Шатилов, А. В. Шатилова, А. М. Хохлова, Л. В. Сапрыгина, А. А. Галкина, Е. А. Турецкий, С. М. Андреев, В. В. Смирнов, М. Р. Хаитов. – Текст : электронный // Вестник аллерголога-иммунолога : тезисы докладов международного конгресса по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-22 (Москва, Российская Федерация, 1-2 декабря 2022 г.). – 2022. – URL: <https://allergovestnik.ru/poluchenie-novogo-poliargininovogo-dendrimernogo-peptida-i-issledovanie-ego-protivomikrobnaj-i-transfeksionnoj-aktivnosti> (Дата обращения: 11.03.2025)