

ОБЗОРЫ

УДК 577.112.6: 577.18.02

©Коллектив авторов

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

С.А. Окороченков¹, Г.А. Желтухина^{1*}, В.Е. Небольсин²

¹Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова 119571, Москва, пр-т Вернадского, 86;
тел.: 8-495-936-89-03; эл. почта: laboratory211@yandex.ru

²ООО “Фарминтерпрайсез”, Москва

Обзор посвящен антимикробным пептидам (АМП), обладающим антибактериальной, противовирусной и антигрибковой активностью. Рассмотрены структура и механизмы действия АМП на липидную мембрану и внутриклеточные мишени патогенов. Проанализировано современное состояние и перспективы практического применения АМП, а также подходы к повышению эффективности и снижению токсичности АМП путём химической модификации их структуры.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, механизм действия, практическое применение.

ВВЕДЕНИЕ. Антимикробные пептиды (АМП) эндогенного происхождения являются частью самой древней защитной системы организмов от патогенов [1]. Они обнаружены практически у всех живых организмов от бактерий до человека [2]. В процессе эволюции многоклеточные организмы развили арсенал АМП, защищающих их от разнообразных патогенов - грамположительных и грамотрицательных бактерий [2], ДНК и РНК-содержащих вирусов [3, 4], грибов [5, 6] и простейших [7, 8]. Одной из отличительных особенностей АМП является высокая скорость бактерицидного действия [9, 10], объясняющаяся, как правило, образованием АМП пор в мембране бактерий [11]. В связи с развитием резистентности бактерий к существующим антибиотикам интерес к АМП в последние годы значительно возрос. Вследствие редкого развития резистентности в отношении АМП у микроорганизмов [12], антимикробные пептиды рассматриваются как новые перспективные средства борьбы с ними [2]. При этом, несмотря на высокую биологическую активность многих представителей АМП, лишь немногие из них нашли применение в медицине [13, 14]. Причинами ограниченной практической применимости АМП являются гемолитический эффект, присущий большинству представителей этого класса соединений, быстрая биodeградация в условиях *in vivo* [1], а так же относительно высокая стоимость. В то же время, некоторые представители АМП лишены вышеперечисленных недостатков [2], что делает возможным применение отдельных АМП в качестве новых антимикробных агентов.

* - адресат для переписки

1. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ.

В настоящее время существует несколько классификаций антибиотиков [15], вследствие чего отнесение того или иного антибиотика к определённому классу представляет некоторое затруднение. Эта проблема существует и в отрасли медико-биологической науки, занимающейся АМП, вследствие чего к АМП иногда относят лантибиотики [1] (бактериальные полипептиды, в состав которых входят тиоэфирные аминокислоты, в частности лантионин и метиллантионин и/или остатки жирных кислот [16]). В настоящем обзоре будут рассмотрены АМП, состоящие только из аминокислот и не содержащие непептидных фрагментов (остатков углеводов, жирных кислот, и др.).

Антимикробные пептиды, как правило, обладают низкой селективностью; они токсичны как в отношении бактерий, так и в отношении эукариотических клеток (как, например, магаинин [17] и индолицидин [18]). В то же время, некоторые АМП (в частности, псевдины [19]) не обладают гемолитическим эффектом в антимикробных концентрациях. Понимание механизмов узнавания антимикробными пептидами клеток патогенов является необходимым условием для создания лекарственных средств на их основе. Наиболее важным фактором, определяющим селективность АМП, является различие в составе мембран бактериальных и эукариотических клеток. Внешняя поверхность мембран эукариотических клеток состоит из цвиттер-ионных фосфолипидов, в то время как мембраны бактериальных клеток содержат большое количество отрицательно заряженных фосфолипидов как на внутренней, так и на внешней поверхности липидного бислоя [20]. Кислый характер внешней стороны мембран прокариот обуславливает её взаимодействие с преимущественно положительно заряженными АМП. Вторым фактором, обуславливающим селективность АМП, является отсутствие холестерина в мембранах бактериальных клеток [20]. Вследствие этого липидный бислой бактериальных мембран обладает большей текучестью, и образование пор антимикробными пептидами в нем происходит легче, чем в мембранах эукариотических клеток. Кроме того, большой отрицательный трансмембранный потенциал на внутренней мембране бактериальных клетках также способствует образованию пор под действием АМП [21].

Антимикробные пептиды, как правило, являются амфифильными соединениями с ярко выраженными гидрофильной и гидрофобной частью [22]. За редкими исключениями, молекулы АМП содержат несколько остатков лизина и/или аргинина и при физиологических значениях pH несут положительный заряд [22]. По структуре АМП можно разделить на две большие группы, а именно, циклические пептиды, структура которых обычно поддерживается -S-S- связями, а также линейные пептиды (рис. 1).

Последние, в свою очередь, можно разделить на “типичные” пептиды, образующие α -спиральную вторичную структуру, и линейные пептиды, имеющие нетипичную вторичную структуру. Последние, как правило, обогащены остатками Pro, Arg или Trp. При этом большинство пептидов имеют в своей последовательности домены с различной вторичной структурой. Поэтому, когда тот или иной пептид относят, например, к α -спиральным АМП, подразумевается, что в его последовательности преобладают α -спиральные домены [23].

“Типичные” линейные пептиды могут находиться в липидном бислое как в виде α -спирали, так и в виде β -слоев. И β -складчатые, и α -спиральные структуры проявляют амфифильные свойства, причём гидрофобные и гидрофильные участки располагаются по разные стороны остова. Амфифильный характер АМП способствует такому взаимодействию с мембранами, при котором полярные участки пептида взаимодействуют с полярной “головкой” фосфолипида, а гидрофобные участки пептида взаимодействуют с жирнокислотными остатками мембраны путём гидрофобных взаимодействий [22].

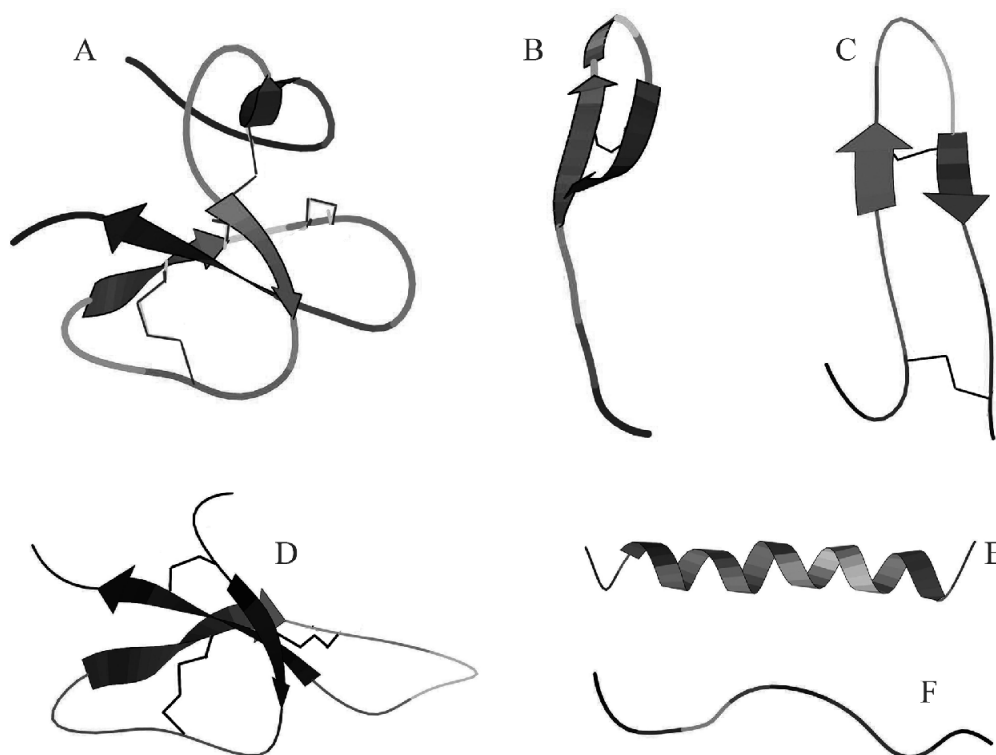


Рисунок 1.

Конформации различных антимикробных пептидов: А - β -дефензин-2 (смешанная конформация); В - танатин (петлевидная конформация); С - β -полифемусина (β -шпилька); D - дефензина-1 (смешанная конформация); Е - магаинина-2 (α -спираль); F - индолицидина (вытянутая конформация) (адаптировано из [24]).

Ранние исследования предполагали наличие прямой зависимости между образованием спиральных структур и литической активностью АМП в отношении микроорганизмов [24]. Однако позднее было показано, что спиральность оказывает гораздо большее влияние на цитотоксическую активность антибактериальных пептидов в отношении эукариотических клеток. Так, исследования цитотоксичности диастереомеров пардаксина и меллитина показали, что потеря α -спиральной структуры приводит к исчезновению гемолитической активности, при этом антибактериальная активность как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий остается прежней [25]. Флуоресцентные исследования на модельных мембранных системах, имитирующих внешние мембраны прокариотических и эукариотических клеток, подтвердили результаты исследований цитотоксичности [25].

Положительно заряженные участки являются важной характеристической чертой антибактериальных пептидов. Именно благодаря им пептиды находят свою цель - мембрану микроорганизмов. Пептиды связываются с молекулами отрицательно заряженных липополисахаридов (ЛПС) - одного из компонентов внешней мембраны грамотрицательных бактерий [27]. Возмущения, возникающие при этом в ЛПС-слое, образуют так называемый "вертикальный саморегулирующийся канал", облегчающий пептиду проникновение к плазматической мембране [21, 28]. Полагают, что при этом АМП создают трещины в слое ЛПС (рис 2А), или связываются с участками в ЛПС (рис 2В), отвечающими за взаимодействие с двухвалентными катионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , необходимыми для стабилизации поверхности клетки и перекрестного связывания отрицательных зарядов ЛПС [29].

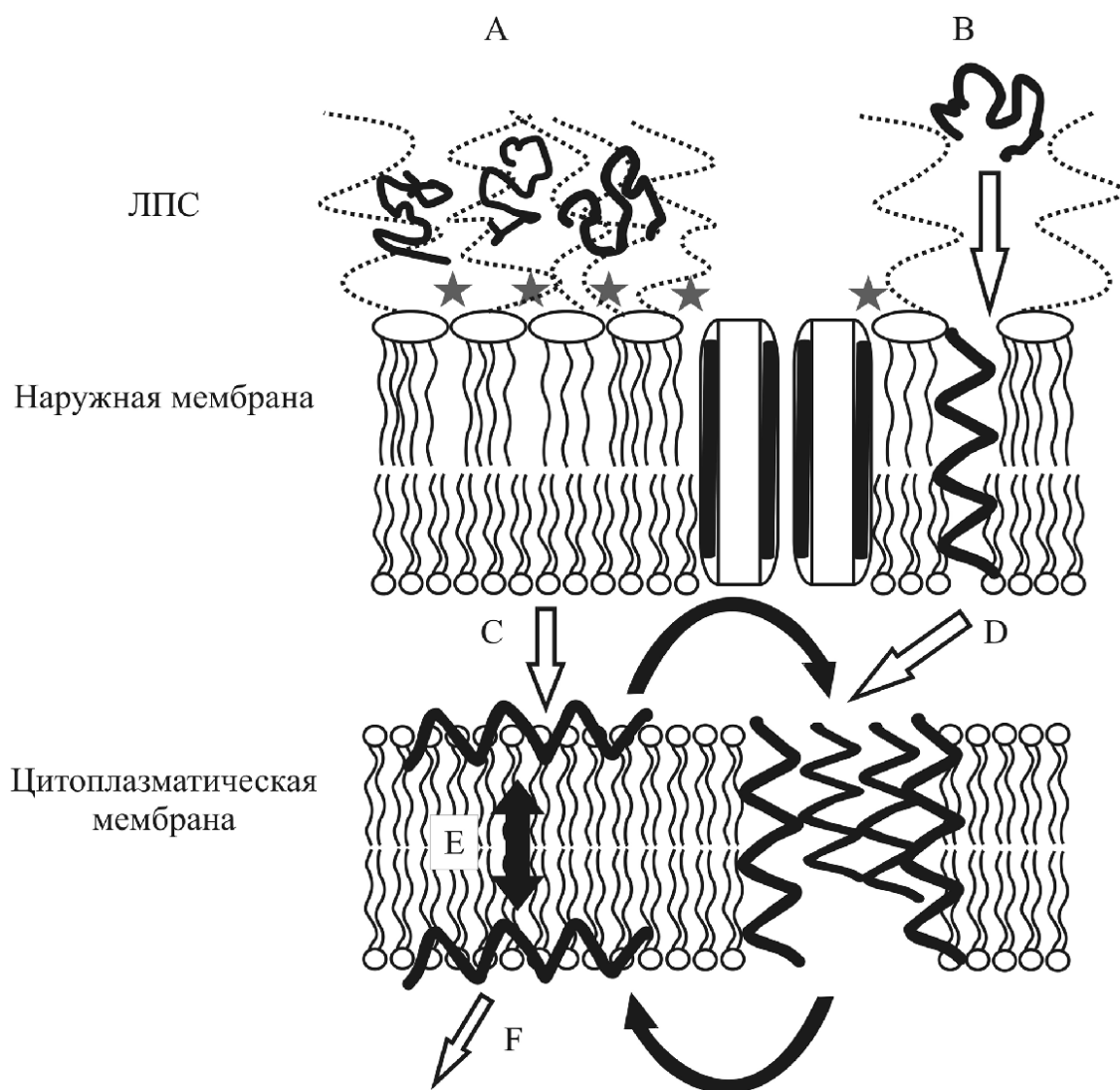


Рисунок 2.

Предполагаемый механизм взаимодействия антимикробных пептидов с клеточной стенкой грамотрицательных бактерий (адаптировано из [26]).

После прохождения через внешнюю мембрану бактериальной клетки антимикробные пептиды связываются с отрицательно заряженной поверхностью цитоплазматической мембраны. При переходе из водной фазы в липидное окружение конформация пептида изменяется [2, 30]. Точно не известно, в какой момент пептид принимает характерную для данного липидного окружения конформацию - при переходе сквозь внешнюю мембрану или в процессе встраивания в цитоплазматическую мембрану. Встроившись в мембрану, АМП образуют различные агрегаты (рис. 2D, гипотезы строения этих агрегатов изложены ниже), или подвергаются флип-флопу (рис. 2E). Подвергшиеся флип-флопу молекулы АМП могут затем диссоциировать во внутреннюю среду бактериальной клетки и вступать во взаимодействие с такими внутриклеточными полианионами как ДНК или РНК (рис. 2F) [31].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что многие АМП после проникновения в мембрану патогена подвергаются агрегации [32, 33]. Образование сложных структур в результате взаимодействия молекул пептида с молекулами липида и/или молекул пептида друг с другом в липидной мембране

является частью механизма действия многих антимикробных пептидов. При этом способность пептидов образовывать агрегаты в липидной мембране зависит исключительно от их аминокислотной последовательности. Так, пептиды с ярко выраженными гидрофобными и гидрофильными доменами могут направлено ориентировать свои гидрофобные и гидрофильные поверхности в направлении соответствующих участков компонентов мембраны и соседних молекул пептида [23]. Пептидные ассоциаты могут иметь форму пор или каналов, которые могут быть как селективными [34], так и неселективными [35]. Например, стенки поры могут быть выстланы гидрофильными участками образующих ее молекул пептида, в то время как гидрофобные участки пептидной цепи будут ориентированы в сторону ацильных цепей фосфолипидов, и, как следствие, через такую пору будут предпочтительнее проходить гидрофильные соединения [34].

При встраивании молекул АМП во внешнюю поверхность липидного бислоя возникает тангенциальное напряжение между наружной и внутренней поверхностью липидного бислоя [23]. При достижении определенной пороговой концентрации молекул антимикробного пептида на наружной поверхности липидной мембраны происходит компенсация напряжения, которая может реализовываться по различным механизмам (рис. 3): путём перераспределения молекул пептида между наружной и внутренней поверхностями мембраны вследствие ускорения флип-флопа [36], образования пор различного строения [37, 38] или разрушения липидной мембраны [39]. Ниже эти механизмы будут рассмотрены более подробно.

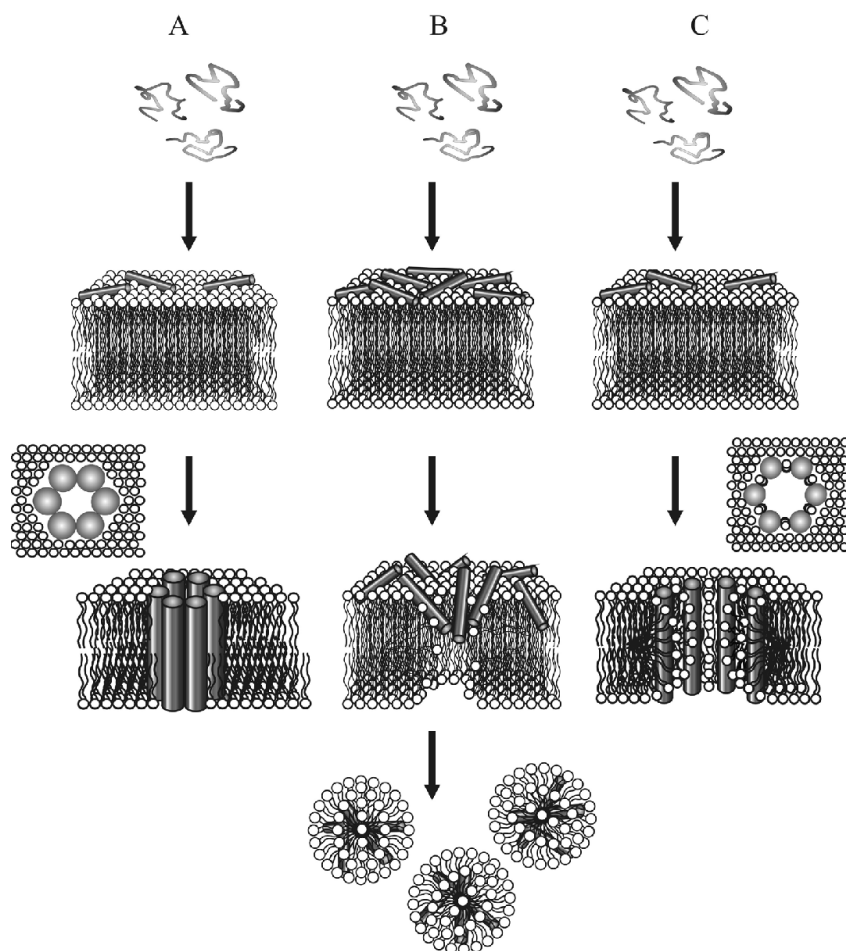


Рисунок 3.

Механизмы взаимодействия липидных мембран с антимикробными пептидами: А-образование цилиндрической поры; В-"ковровый" механизм; С- образование тороидальной поры (адаптировано из [23]).

Модель цилиндрической (“barrel-stave”) поры (рис. 3А). В случае доминирования гидрофобных взаимодействий, пептидные цепи встраиваются в липидный бислой перпендикулярно его поверхности. Включение новых полипептидных цепей приводит к увеличению трансмембранного “пучка” пептидных молекул и образованию цилиндрической поры. В то время как гидрофобная часть пептидной цепи взаимодействует с неполярными ацильными цепями липидов, гидрофильные участки пептида образуют внутреннюю поверхность поры [27]. Минимальная длина аминокислотной последовательности пептида для реализации этой модели составляет ~22 аминокислотных остатка в случае α -спиральных пептидов и ~8 аминокислотных остатков для пептидов, имеющих β -складчатую структуру [40]. При этом количество молекул АМП, образующих пору, может быть различным и зависит от концентрации АМП. Так, аламетицин образует поры, состоящие из 3-11 молекул пептида со средним диаметром 4 нм [41, 42]. Данный тип взаимодействия характерен для небольшого числа пептидов (аламетицина, пардаксина, и др.), отличающейся крайне низкой селективностью и токсичных в отношении нормальных клеток [40].

Модель “ковра” (рис. 3В). Этот механизм реализуется в случае сильных электростатических взаимодействий между положительно заряженными участками молекул пептида и отрицательно заряженными полярными головками молекул липида. При этом пептидные цепи ориентируются параллельно поверхности мембраны [43] и локализуются на поверхности липидного бислоя [44]. После достижения определенной критической концентрации пептида на поверхности липидной мембраны происходит её разрушение с образованием мицелл [45, 46]. При этом в мембране образуются очень крупные (~25 нм) тороидальные поры (подробнее о тороидальных порах см. ниже) [35]. Образование поры в данной модели является промежуточным шагом на пути к разрушению мембраны, а сама пора не является устойчивой структурой [11].

Модель тороидальной поры (рис. 3С). Согласно этой модели, компенсация напряжения, вызванного встраиванием в мембрану пептидных цепей, происходит путем изгиба наружной стороны мембраны в сторону внутренней и объединения поверхностей мембран; при этом образуется пора, имеющая форму внутренней поверхности тора [47]. Молекулы пептида, находившиеся на поверхности мембраны, погружаются в гидрофобную часть мембраны, втягиваясь в липидный бислой. В результате образуется пора, стенки которой совместно выстилают гидрофильные участки молекул пептида и полярные головки пептидов (поверхность цилиндрической поры, в отличие от тороидальной, образована только молекулами пептида). Тороидальные поры, как правило, имеют больший размер [11], нежели цилиндрические. Так, тороидальная пора, образованная магаинином, и состоящая из 4-7 молекул пептида и ~90 молекул фосфолипида, имеет внутренний диаметр 3-5 нм, и наружный 7,0-8,4 нм [48].

В настоящее время важной проблемой остается изучение механизма токсичности АМП в отношении клеток патогена и клеток организма хозяина. Долгое время считалось, что АМП уничтожают микроорганизмы, образуя многочисленные неустраняемые повреждения их мембранам. Действительно, АМП могут формировать поры в мембране микроорганизмов, как описано выше. Вследствие утечки ионов и метаболитов, а также вследствие деполяризации мембраны (приводящей к её дисфункции), угнетения клеточного дыхания и синтеза биополимеров, микроорганизм, “атакованный” молекулами АМП, может погибнуть. Однако, по последним данным [49, 50], гибель клеток под действием АМП может происходить по другим механизмам, например, в результате взаимодействия антимикробных пептидов с внутриклеточными мишенями. Представляется, что механизм гибели клеток под действием АМП требует дальнейшего изучения и уточнения.

Ниже будут более подробно рассмотрены процессы, происходящие в клетке, взаимодействующей с АМП. Цитоплазматическая мембрана поддерживает нормальное функционирование микроорганизма. Она обеспечивает селективную

проницаемость, поддержание электрохимического градиента, транспорт электронов и окислительное фосфорилирование (в эукариотических патогенах, например, в грибах, этот процесс происходит в митохондриальной мембране), синтез и конъюгацию пептидогликана, хитина и др. биополимеров. Из этого следует, что вызванная АМП дисфункция внешней и/или плазматической мембраны может вызвать нарушение одной или нескольких из этих функций, приводя, таким образом, прямо или косвенно к гибели клетки.

Было показано [51], что во многих случаях гибель бактерий под действием АМП не может быть объяснена только дисфункцией мембраны. Так, для различных пептидов, отличающихся цитотоксичностью в отношении *S. aureus*, отсутствовала корреляция между цитотоксичностью и степенью нарушения целостности мембран этой бактерии. В другом исследовании [52] было показано, что грамицидин S быстро деполяризует цитоплазматическую мембрану *Pseudomonas aeruginosa*. При этом данная бактерия проявляет резистентность по отношению к грамицидину S. В то же время, токсичные в отношении этого микроорганизма полимиксины В и Е1 не вызывают деполяризации его мембраны. Эти наблюдения позволяют сделать вывод о том, что вызываемые АМП нарушения целостности мембраны и гибель бактериальных клеток могут быть независимыми друг от друга событиями.

Ингибирование процессов синтеза пептидогликана, хитина или других макромолекул также является важным механизмом действия АМП. Например, биосинтез пептидогликана неразрывно связан с целостностью и нормальным функционированием мембраны бактериальной клетки. Активированные предшественники пептидогликана транспортируются сквозь цитоплазматическую мембрану и конъюгируются друг с другом в непосредственной близости от неё. Как уже упоминалось выше, катионные пептиды вызывают возмущения в мембране и тем самым нарушают цикл синтеза пептидогликана, прямо или косвенно ингибируя синтез и транслокацию его предшественников и/или их конъюгацию. Учитывая высокое содержание пептидогликана в мембране грамотрицательных микроорганизмов, они должны быть особенно подвержены действию АМП по этому механизму. Так, показано, что АМП плазмин ингибирует синтез пептидогликана у *E. coli* [53].

Хотя нарушения в клеточной мембране являются ключевым моментом в механизме вызываемой АМП гибели клеток, некоторые исследования показывают, что взаимодействие пептидов с внутриклеточными мишенями также играет важную роль в механизме цитотоксичности антимикробных пептидов [54-56]. Так, в некоторых случаях микроорганизмы погибали лишь спустя достаточно продолжительный период после нарушения целостности их мембран под действием АМП, что позволило высказать предположение о том, что их гибель происходила не по мембранолитическому механизму. В исследовании механизма цитотоксичности антимикробного пептида tPMР, было показано [57], что обработанные этим агентом клетки *S. aureus* сохраняют жизнеспособность в течение долгого времени после нарушения целостности их мембран, однако впоследствии погибают. В этом исследовании было показано, что гибель бактерий наступает вследствие прямого ингибирования биосинтеза нуклеиновых кислот при действии tPMР.

Таким образом, АМП, проявляющие антибактериальные свойства, являются наиболее многочисленным и наиболее хорошо изученным классом антимикробных пептидов. Несмотря на то, что лишь немногие АМП нашли применение в медицинской практике, изучение этого класса соединений продолжает привлекать внимание значительного числа исследователей в мире. Повышенное внимание к антибактериальным АМП обусловлено редким развитием резистентности к ним у бактерий, что делает весьма привлекательным дизайн новых антибиотиков на основе антимикробных пептидов.

2. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ, ПРОЯВЛЯЮЩИЕ ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ.

Отдельные АМП, наряду с антибактериальной активностью обладают выраженными противовирусными свойствами [24]. Так, было показано, что противовирусная активность многих АМП (например, лактоферринов), обусловлена их связыванием с гепарансульфатом, которым обогащена поверхность клеток [58]. Гепарансульфат представляет собой протеогликан, к белковому компоненту которого ковалентно присоединена одна или несколько сульфированных глюкозаминогликановых цепочек. Вследствие высокого содержания сульфогрупп гепарансульфат является наиболее отрицательно заряженным компонентом поверхности клетки, что определяет легкость связывания с ним положительно заряженных внеклеточных лигандов [59], а также многих патогенов, в том числе вирусов [60]. Показано, что связывание с гепарансульфатом является первым этапом проникновения в клетку многих вирусов [61, 62]. Согласно данным [63, 64], блокирование гепарансульфата на поверхности клетки затрудняет инфицирование клетки вирусом. Кроме того, было показано, что рекомбинантные клетки с пониженной экспрессией гепарансульфата или хондроитинсульфата менее подвержены (на 80% и 60% соответственно) заражению вирусом герпеса простого (ВГП) [65]. Повышенное содержание гепарансульфата на поверхности клетки является также необходимым условием для внедрения в неё вируса гепатита С [66].

Изложенные выше факты позволяют сделать предположение о том, что временное блокирование молекул гепарансульфата на поверхности клеток может предотвратить развитие вирусной инфекции в организме. АМП, обладающие противовирусными свойствами, несут сильный суммарный положительный заряд, вследствие чего легко связываются с молекулами гепарансульфата на поверхности клетки, препятствуя таким образом связыванию с ними вирусов. Так, было показано, что антимикробный пептид меллитин предохраняет здоровые клетки от внедрения в них ВГП [67]. При этом меллитин имеет повышенное сродство к гепарансульфату, что подтверждено данными изотермического калориметрического титрования [68]. Лактоферрин и его аналоги также проявляют высокое сродство к гепарансульфату [69]. Клетки, обработанные аналогами лактоферрина, менее подвержены заражению ВГП, нежели необработанные клетки, в то время как обработка этими пептидами суспензии ВГП не приводила к ингибированию вируса [69]. Противовирусная активность АМП группы кателицидина также обусловлена его связыванием с молекулами гепарансульфата [70].

Напротив, для некоторых АМП противовирусная активность обусловлена прямым их взаимодействием с вирусной частицей. Как правило, АМП связываются с гликопротеинами оболочки вируса. Так, АМП дефензины обладают способностью связываться с частицами аденовируса. Дефензины ингибируют разборку вирусной частицы в районе “верхушки” вириона, ограничивая выход внутреннего капсидного белка, рVI, который необходим для разрушения мембраны эндосомы и дальнейшего проникновения в клетку. Таким образом, дефензины препятствуют выходу частиц аденовируса из эндосом, вследствие чего вирионы накапливаются в районе лизосом и дезактивируются [71]. Пептиды класса α -дефензинов способны угнетать адсорбцию другого вируса - полиомы, связываясь с гликопротеинами на его поверхности, а так же ингибировать сборку вирусной частицы [72].

Кроме того, некоторые АМП могут взаимодействовать с липидной оболочкой вирусов, вызывая ее лизис, дестабилизацию или образуя в ней поры [24]. Так, АМП индолицидин инактивирует ВИЧ-1 вследствие нарушения мембраны вириона [73]. Сходную активность продемонстрировал пептид дермасептин (Dennaseptin) [74]. При этом он не оказывает прямого действия на мембрану ВГП, однако угнетает его адсорбцию на нормальных клетках [75].

Несмотря на достаточно интенсивные исследования активности АМП в отношении вирусов механизм селективной токсичности АМП в отношении вирусов пока изучен недостаточно.

3. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С АНТИГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ.

Многие АМП демонстрируют значительную активность в отношении патогенных микроскопических грибов [24], главным образом вызывая их лизис [5]. При этом взаимосвязь между структурой и свойствами в ряду антигрибковых АМП в настоящее время значительно менее исследована, чем взаимосвязь между структурой и свойствами АМП, проявляющих антибактериальные свойства. Так, выраженная антигрибковая активность показана для пептидов, имеющих совершенно разные структурные мотивы. Это относится к антигрибковому пептиду, выделенному из растения *Eucommia ulmoides*, содержащему 5 дисульфидных мостиков [76], пептиду P18, имеющему α -спиральную структуру [77], “вытянутому” индолицидину [78] и β -складчатому колеоптерану (coleopteran) из *Acrocisus longimanus* [79].

В настоящее время ведутся многочисленные исследования по изучению противогрибковой активности АМП [80-83]. При этом, оказалось невозможным описать взаимодействие АМП с патогенными грибами при помощи универсального механизма, как и в случае взаимодействия АМП с вирусами и бактериями. В работе [83] показано, что пептидные фрагменты из последовательности лактоферрина, проявляющие существенную противогрибковую активность в отношении *Candida albicans*, угнетают биосинтез компонентов наружной мембраны, а также вызывают утечку АТФ из клеток этого микроскопического гриба. В то же время пептид плевроцидин, выделенный из *Pseudopleuronectes americanus*, действует по мембранолитическому механизму [81]. Дефензины растений связываются с некоторыми компонентами наружной мембраны клеток микроскопических грибов, нарушая таким образом транспорт через мембрану и угнетая синтез компонентов их наружной мембраны [80]. Выделенный из тучных клеток окуня пептид писцидин-2, образует поры в мембране грибковой клетки, приводя таким образом к её гибели [82].

Фунгицидная активность некоторых АМП является предметом дискуссий. Так, в работе [84] было высказано предположение, что токсичность антимикробного пептида хистатина-5 в отношении *C. albicans*, *C. neoformans* и некоторых других грибов обусловлена образованием активных форм кислорода (АФК) в их клетках под действием этого пептида. Авторы [84] выдвинули гипотезу о том, что после попадания в клетки микроскопических грибов хистатин-5 проникает в митохондрии и ингибирует цикл кофермента Q, что приводит к накоплению в клетке АФК, и, как следствие, гибели клетки вследствие окисления под действием АФК внутриклеточных субстратов. С другой стороны, в статье [85] высказана другая точка зрения заключающаяся в том, что хистатин-5 не приводит к повышению уровня АФК в клетках грибов, а фунгицидное действие этого пептида обусловлено вызванной им утечкой АТФ из грибковых клеток. По мнению авторов [85], ошибочные выводы, сделанные в работе [84] обусловлены ненадежностью метода детектирования АФК, примененного в этой работе.

4. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ АМП.

Основными препятствиями к применению АМП в клинической практике являются их высокая стоимость, чувствительность к действию протеолитических ферментов, а также присущий многим АМП гемолитический эффект [1]. Тем не менее, препараты на основе АМП разрабатываются многими фармацевтическими компаниями. Ниже приведены отдельные примеры таких препаратов.

Омиганан (Omiganan). Активным компонентом является синтетический аналог 13-членного антимикробного пептида индолицидина. Разработчик - Microbiologix Biotech. В ходе III фазы клинических испытаний в качестве препарата, понижающего колонизацию венозных катетеров микроорганизмами,

вызывающими заболеваниями кровеносной системы в разных группах пациентов, показал различные результаты, не позволяющие сделать однозначный вывод о возможности его применения в клинической практике [86]. Повторные исследования показали, что омиганан в виде 1% геля подавляет колонизацию катетеров практически всеми известными бактериями и микроскопическими грибами [87].

MX594AN. Действующим началом является синтетический аналог 13-членного антимикробного пептида индолицидина. Разработчик - Microbiologix Biotech. Успешно прошел клинические испытания IIb фазы в качестве препарата для лечения угревой сыпи, в настоящее время проходит клинические испытания фазы III [86].

hIF1-II. Представляет собой 11-членный антимикробный пептид из N-концевой части человеческого лактоферрина. Разрабатывается AM-Pharma. В настоящее время проходят клинические испытания фазы II в качестве антигрибкового и антимикробного средства [1, 88].

P113/P113D. Основой препарата является 12-членный пептид - модифицированный хистатин (histatin) [89]. Разработчик – Demergen/Pasgen. Продемонстрирована эффективность при оральных кандидозах. Прошёл II стадию клинических испытаний. Предполагается проведение III стадии клинических испытаний в ингаляционной форме [1].

Кроме того, несколько препаратов на основе АМП находятся на более ранних стадиях клинических испытаний [1, 86].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Несмотря на то, что АМП проявляют высокую активность в отношении различных патогенов в условиях *in vitro*, они не нашли широкого применения в клинической практике из-за высокой стоимости, подверженности протеолизу и присущей им гемолитической активности. Вследствие этого в последнее время всё большее внимание уделяется дизайну модифицированных АМП [90], лишенных перечисленных выше недостатков. Основными стратегиями оптимизации структуры АМП с целью получения новых биоцидных агентов являются синтез циклических аналогов АМП [91], введение в молекулу АМП атома фтора или трифторметильной группы [92], синтез разветвленных АМП (дендримеров) [93, 94], а также синтез АМП, иммобилизованных на различных полимерных матрицах [95]. Таким образом, АМП остаются в центре внимания многочисленных исследовательских групп в мире, привлекающих интерес как к научным, так и к практическим аспектам их действия и применения в качестве новых антибиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке АБЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” № 2.1.1./2889.

ЛИТЕРАТУРА

1. Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. (2007) Cent. Eur. J. Biol., **2**(1), 1-33.
2. Yeaman M., Yount N.Y. (2003) Pharmacol. Rev., **55**(1), 27-55.
3. Bastian A., Schafer H. (2001) Regul. Pept., **101**, 157-161.
4. Horne W., Wiethoff C., Cui C., Wilcoxon K., Amorin M., Ghadiri M., Nemerow G. (2005) Bioorg. Med. Chem., **13**, 5145-5153.
5. De Lucca A., Walsh T. (1999) Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 1-11.
6. Lustig F., Hoebeke J., Ostergren-Lunden G., Velge-Roussel F., Bondjers G., Olsson U., Ruetschi U., Fager G. (1996) Biochemistry, **35**, 12077-12085.
7. Alberola J., Rodriguez A., Francino O., Roura X., Rivas L., Andreu D. (2004) Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 641-643.
8. Zasloff M. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 5449-5453.
9. Pranting M., Negrea A., Rhen M., Andersson D. (2008) Antimicrob. Agents Chemother., **52**(8), 2734-2741.

10. *Zasloff M.* (2007) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 2810-2816.
11. *Brogden K.* (2005) *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 238-250.
12. *Bals R.* (2000) *Respir. Res.*, **1**, 141-150
13. *Faber C., Stallmann H., Lyaruu D., Joosten U., Von Eiff C., Van Nieuw Amerongen A., Wuisman P.I.* (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2438-2444.
14. *Nibbering P., Ravensbergen E., Welling M., Van Berkel L., Van Berkel P., Pauwels E., Nuijens J.* (2001) *Infect. Immun.*, **69**, 1469-1476.
15. *Егоров Н.С.* (2004) Основы учения об антибиотиках, Наука, Москва, с. 22-48.
16. *Егоров Н.С., Баранова И.П.* (1999) Антибиот. химиотер., **6**, 33-40.
17. *Imura Y., Choda N., Matsuzaki K.* (2008) *Biophys. J.*, **95**, 5757-5765.
18. *Smirnova M., Afonin V., Shpen' V., Tyagotin Yu., Kolodkin N.* (2004) *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **30**(5), 458-465.
19. *Olson L., Soto A., Knoop F., Conlon J.* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 1001-1005.
20. *Gunstone F., Harwood J., Dijkstra A.* (2007) in: *The Lipid Handbook* CRC Press, NY, pp. 134-141.
21. *Hancock R.* (1997) *Lancet*, **349**, 419-422.
22. *Powers J.-P., Hancock R.* (2003) *Peptides*, **24**, 1681-1691.
23. *Toke O.* (2005) *Biopolymers*, **80**, 717-735.
24. *Jenssen H., Hamill P., Hancock R.* (2006) *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 491-511.
25. *Shai Y., Oren Z.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 1826-1835.
26. *Hancock R., Chapple D.* (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1317-1323.
27. *Morris M., Depollier J., Mery J., Heitz F., Divita G.* (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1173-1176.
28. *Piers K., Brown M., Hancock R.* (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2311-2316.
29. *Silva A. Jr., Teschke O.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1643**, 95-103.
30. *Ovchinnikova T., Shenkarev Z., Balandin S., Nadezhdin K., Paramonov A., Kokryakov V., Arseniev A.* (2008) *Biopolymers*, **89**, 455-464.
31. *Zanetti M., Litteri L., Gennaro R., Horstmann H., Romeo D.* (1990) *J. Cell. Biol.*, **111**, 1363-1371.
32. *Takeuchi K., Takahashi H., Sugai M., Iwai H., Kohno T., Sekimizu K., Natori S., Shimada I.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 4981-4987.
33. *Mani R., Cady S., Tang M., Waring A., Lehrer R., Hong M.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16242-16247.
34. *Christensen B., Fink J., Merrifield R., Mauzerall D.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5072-5076.
35. *Ladokhin A., Selsted M., White S.* (1997) *Biophys. J.*, **72**, 1762-1766.
36. *Zhao H., Mattila J.-P., Holopainen J., Kinnunen P.* (2001) *Biophys. J.*, **81**, 2979-2991.
37. *Sengupta D., Hari L., Mark A., Marrink S.-J.* (2008) *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1778**, 2308-2317.
38. *Bessin Y., Saint N., Marri L., Marchini D., Molle G.* (2004) *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1667**, 148-156.
39. *Papo N., Shai Y.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 458-466.
40. *Mateo C., Villalain J., Gonzales-Ros J.* (2006) in: *Protein-Lipid Interactions: New Approaches and Emerging Concepts*, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 190.
41. *Spaar A., Munster C., Salditt T.* (2004) *Biophys. J.*, **87**, 396-407.
42. *He K., Ludtke S., Huang H., Worcester D.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 15614-15618.
43. *Bechinger B.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 157-183.
44. *Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P., Shai Y.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 12416-12423.
45. *Shai Y.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 55-70.
46. *Ladokhin A., White S.* (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1514**, 253-260

47. Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. (1996) *Biochemistry*, **35**, 11361–11368.
48. Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1327**, 119–130.
49. Gennaro R., Zanetti M. (2000) *Biopolymers*, **55**, 31–49.
50. Park C., Yi K., Matsuzaki K., Kim M., Kim S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8245–8250.
51. Koo S.P., Bayer A., Yeaman M. (2001) *Infect. Immun.*, **69**, 4916–4922.
52. Zhang L., Rozek A., Hancock R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35714–35722.
53. Chitnis S., Prasad K. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**, 281–284.
54. Lehrer I., Barton A., Daher K.A., Harwig S., Ganz T., Selsted M. (1989) *J. Clin. Invest.*, **84**, 553–561.
55. Park C., Kim H., Kim S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 253–257.
56. Sharma S., Verma I., Khuller G. (1999) *Arch. Microbiol.*, **171**, 338–342.
57. Xiong Y., Bayer A., Yeaman M. (2002) *J. Infect. Dis.*, **186**, 668–677.
58. Bernfield M., Kokenyesi R., Kato M., Hinkes M., Spring J., Gallo R., Lose E. (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 365–393.
59. Parish C. (2006) *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 633–643.
60. Rostand K.S., Esko J. (1997) *Infect. Immun.*, **65**, 1–8.
61. James S., Gibbs B., Toney K., Bennett H. (1994) *Anal. Biochem.*, **217**, 84–90.
62. Tamamura H., Xu Y., Hattori T., Zhang X., Arakaki R., Kanbara K., Omagari A., Otaka A., Ibuka T., Yamamoto N., Nakashima H., Fujii N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 877–882.
63. Shieh M., Wudunn D., Montgomery R., Esko J., Spear P. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 1273–1281.
64. Wudunn D., Spear P. (1989) *J. Virol.*, **63**, 52–58.
65. Mardberg K., Trybala E., Tufaro K., Bergstrom T. (2002) *J. Gen. Virol.*, **83**, 291–300.
66. Bals R., Wang X., Wu Z., Freeman T., Bafna V., Zasloff M., Wilson J. (1998) *J. Clin. Investig.*, **102**, 874–880.
67. Baghian A., Jaynes J., Enright F., Kousoulas K. (1997) *Peptides*, **18**, 173–183.
68. Klocek G., Seelig J. (2008) *Biochemistry*, **47**, 2841–2849.
69. Andersen J., Jenssen H., Sandvik K., Gutteberg T. (2004) *J. Med. Virol.*, **74**, 262–271.
70. Kaneider N., Djanani A., Wiedermann C. (2007) *Sci. World J.*, **7**, 1832–1838.
71. Smith J., Nemerow G. (2008) *Cell Host Microbe*, **3**, 11–19.
72. Dugan A., Maginnis M., Jordan J., Gasparovic M., Manley K., Page R., Williams G., Porter E., O'hara B., Atwood W. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**(45), 31125–31132.
73. Robinson W., Mcdougall B., Tran D., Selsted M. (1998) *J. Leukoc. Biol.*, **63**, 94–100.
74. Lorin C., Saidi H., Belaid A., Zairi A., Baleux F., Hocini H., Belec L., Hani K., Tangy F. (2005) *Virology*, **334**, 264–275.
75. Benincasa M., Skerlavaj B., Gennaro R., Pellegrini A., Zanetti M. (2003) *Peptides*, **24**, 1723–1731.
76. Huang R., Xiang Y., Tu G., Zhang Y., Wang D. (2004) *Biochemistry*, **43**, 6005–6012.
77. Lee D., Hahm K., Shin S. (2004) *Biotechnol. Lett.*, **26**, 337–341.
78. Lee D., Kim H., Kim S., Park Y., Park S., Jang S., Hahm K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 305–310.
79. Barbault F., Landon C., Guenneugues M., Meyer J., Schott V., Dimarcq J., Vovelle F. (2003) *Biochemistry*, **42**, 14434–14442.
80. Thevissen K., Ferket K., Francois I., Cammue B. (2003) *Peptides*, **24**, 1705–1712.
81. Sung W., Lee D. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 858–861.
82. Sung W., Lee J., Lee D. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 551–555.
83. Tanida T., Okamoto T., Ueta E., Yamamoto T., Osaki T. (2006) *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**, 94–103.

84. *Helmerhorst E., Troxler R., Oppenheim F.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14637-14642.
85. *Veerman E., Nazmi K., van't Hof W., Bolscher J., Hertog A., Amerongen A.* (2004) *Biochem. J.*, **381**, 447-452.
86. *Gordon Y., Romanowski E., Mcdermott A.* (2005) *Curr. Eye Res.*, **30**, 505-515.
87. *Fritsche T., Rhomberg P., Sader H., Jones R.* (2008) *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 1092-1098.
88. *Dijkshoorn L., Bogaards S., Nemec A., Van Den Broek P., Nibbering P.* (2004) *J. Antimicrob. Chemother.*, **48**, 4919-4921.
89. *Umadevi S., Linh T., Nuria S., Christopher R., Alan A., Phillip F., Janet F., David R.* (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 3437-3444.
90. *Knappe D., Stegemann C., Nimptisch A., Kolobov A., Korableva E., Shamova O., Kokryakov V., Hoffmann R.* (2009) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **611**, 395-396.
91. *Wessolowski A., Bienert M., Dathe M.* (2004) *J. Pept. Res.*, **64**, 159-169.
92. *Gimenez D., Andreu C., Del Olmo M., Varea T., Diaz D., Asensio G.* (2006) *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6971-6978.
93. *Lee C., Mackay J., Frechet J., Szoka F.* (2005) *Nature Biotechnol.*, **23**, 1517-1526.
94. *Khrushcheva A., Kashparova I., Klimenkova L., Mitina Yu.* (2007) *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **33**(6), 544-548
95. *Bagheri M., Beyermann M., Dathe M.* (2009) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**(3), 1132-1141.

Поступила: 22. 12. 2009.

ANTIMICROBIAL PEPTIDES: MODE OF ACTION AND PERSPECTIVES OF PRACTICAL APPLICATION

S.A. Okorochenkova¹, G.A. Zheltukhina¹, V.E. Nebol'sin²

¹M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo, 86,
Moscow, 119571 Russia; tel.: +7-495-936-89-03; e-mail: laboratory211@yandex.ru

²LTD "Pharmenterprises", Moscow, Russia

This review is devoted to antimicrobial peptides (AMP's) that demonstrate activity against bacteria, viruses and fungi. It considers structure and mechanism of AMP interaction with lipid membrane and intracellular targets of pathogens. Special attention is paid to modern state and perspectives of AMP practical application and also to approaches that increase efficacy and reduce toxicity of AMP by chemical modification of their structure.

Key words: antimicrobial peptides, mode of action, practical application.