

- pared with monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 2022;111(4):857-866. <https://doi.org/10.1002/JLB.5A0321-162R>
20. Mohan A., Neequaye N., Malur A., Soliman E., McPeck M. [et al.]. Matrix Metalloproteinase-12 Is Required for Granuloma Progression. *Front. Immunol.* 2020;11:553949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.553949>
21. Wang N., Liang H., Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* 2014;5:614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
22. Lafon M., Blaye C., Kind M., Bechade D., Chassaigne F. [et al.]. Sarcoidosis-like reaction in metastatic triple negative breast cancer treated by anti-PD-L1. *Breast J.* 2019;25(5):971-973. <https://doi.org/10.1111/tbj.13386>
23. Li Y., Flavell R. R., Juarez R., Chow M., Wu C. [et al.]. Retrospective study of the incidence of sarcoidosis-like reaction in patients treated with immunotherapy. *Clin. Radiol.* 2023;78(2):e131-e136. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2022.09.127>

Поступила 03.04.2024

**Сведения об авторах:**

Аблякимов Эльмар Тофикович, ассистент кафедры патологической анатомии с секционным курсом; тел.: +79788142217; e-mail: ablyakimov1995@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3665-997X>

Кривенцов Максим Андреевич, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой; тел.: +79787092328; e-mail: maksimkgmu@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5193-4311>

© Коллектив авторов, 2024

УДК 615.28

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19071>

ISSN – 2073-8137

## Эффективность катионного пептида PEP-36E против устойчивых к карбапенемам грамотрицательных бактерий *in vitro* и *in vivo*

А. Д. Болатчиев, В. А. Батурин, И. И. Ольшанская, А. А. Вартанян, Е. Ю. Болатчиева, Н. Н. Диденко, Д. М. Кумукова, Е. Э. Бекназаров

Ставропольский государственный медицинский университет,  
Российская Федерация

## Cationic peptide PEP-36E is effective against carbapenem-resistant gram-negative bacteria *in vitro* and *in vivo*

Bolatchiev A. D., Baturin V. A., Olshanskaya I. I., Vartanyan A. A., Bolatchieva E. Yu., Didenko N. N., Kumukova D. M., Beknazarov E. E.

Stavropol State Medical University, Russian Federation

Устойчивость к антибиотикам ежегодно становится причиной 1,2 млн прямых и 4,95 млн ассоциированных смертей. Классические антибиотики на основе малых молекул не привлекательны с инвестиционной точки зрения для фармацевтических компаний из-за быстрого формирования резистентности. Антимикробные пептиды (АМП) обладают выраженной антибактериальной активностью при значительно меньшей вероятности формирования резистентности. Для *de novo* разработки новых АМП могут быть использованы различные методы машинного обучения. Ранее нами был разработан короткий катионный АМП PEP-36E, показавший в ходе работы активность *in vitro* против грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам. Более того, PEP-36E в эмпирической дозе 100 мкг/мышь снижал летальность в обеих моделях генерализованной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, антибиотикорезистентность

Antibiotic resistance causes 1.2 million direct and 4.95 million associated deaths annually. Classic small molecule antibiotics are not attractive from an investment point of view for pharmaceutical companies due to the rapid development of resistance. Antimicrobial peptides (AMPs) have pronounced antibacterial activity with a significantly lower probability of developing resistance. Various machine learning methods can be used for *de novo* development of new AMPs. Previously, we developed a short cationic AMP PEP-36E. In the course of the work, it was shown that PEP-36E is active *in vitro* against Gram-negative bacteria resistant to carbapenems. Moreover, PEP-36E at an empirical dose of 100 µg/mouse reduced mortality in both models of generalized infection caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*.

**Keywords:** antimicrobial peptides, antibiotic resistance

**Для цитирования:** Болатчиев А. Д., Батуринов В. А., Ольшанская И. И., Вартанян А. А., Болатчиева Е. Ю., Диденко Н. Н., Кумукова Д. М., Бекназаров Е. Э. Эффективность катионного пептида PEP-36E против устойчивых к карбапенемам грамотрицательных бактерий *in vitro* и *in vivo*. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2024;19(4):324-326. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19071>

**For citation:** Bolatchiev A. D., Baturin V. A., Olshanskaya I. I., Vartanyan A. A., Bolatchieva E. Yu., Didenko N. N., Kumukova D. M., Beknazarov E. E. Cationic peptide PEP-36E is effective against carbapenem-resistant gram-negative bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Medical News of North Caucasus*. 2024;19(4):324-326. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2024.19071> (In Russ.)

АМП – антимикробный пептид  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

МПК – минимальная подавляющая концентрация

**С**истематический анализ глобального бремени антибиотикорезистентности показал, что в 2019 году 1,27 миллиона пациентов погибли от инфекций, не чувствительных к антибактериальным препаратам (показана прямая причинно-следственная связь) [1]. В данной работе были исследованы записи о 471 миллионе случаев микробных инфекций. Более того, 4,95 миллиона смертей были ассоциированы с антибиотикорезистентностью. Наибольшую опасность представляли шесть патогенов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* – на их долю приходилось более 70 % смертей от антибиотикорезистентных возбудителей; при этом летальность на 100 000 населения составила 67,7 (45,4–96,6) случая [1]. Столь масштабное распространение устойчивых к противомикробным препаратам возбудителей определяет необходимость поиска и разработки новых стратегий фармакотерапии.

Для *de novo* дизайна новых пептидных соединений с фармакологической активностью возможно применение различных методов искусственного интеллекта и машинного обучения, в которых аминокислотные последовательности представляются в виде текстовых данных [2, 3]. Ранее с помощью данных методов нами был разработан катионный антимикробный пептид (АМП) PEP-36E, содержащий 24 аминокислотных остатка.

Целью данной работы было исследование антибактериальной активности PEP-36E *in vitro* и *in vivo*.

**Материал и методы.** PEP-36E, состоящий из 24 аминокислотных остатков (GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNIGK), был синтезирован методом твердофазного Fmoc-синтеза с помощью автоматического синтезатора JBMS-96-A (Jianbang Pharmacy Technology Co. Ltd.). PEP-36E был очищен (чистота >95 %) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой. ВЭЖХ проводили на колонке YMC-Triart C18 (4,6×250 мм×5 мкм), элюируя 0,1 % трифторуксусной кислоты в 100 % воде и 0,1 % трифторуксусной кислоты в 100 % ацетонитриле, при скорости потока 1 мл/мин.

В ходе работы были использованы клинические бактериальные изоляты карбапенем-устойчивых грамотрицательных бактерий: *A. baumannii* (n=4), *P. aeruginosa* (n=4), *K. pneumoniae* (n=8) и *E. coli* (n=8). Бактерии были выделены в 2024 году у госпитализированных пациентов Ставропольской краевой клинической больницы. Идентификацию и определение антибиотикорезистентности бактериальных изолятов проводили диско-диффузионным методом в рамках рутинного микробиологического исследования в отделении клинической микробиологии Цен-

тра клинической фармакологии и фармакотерапии (г. Ставрополь).

Исследование антибактериальной активности PEP-36E *in vitro* проводили методом серийных разведений. Чистые бактериальные культуры культивировались на твердой питательной среде (маннитол-солевой агар). Из свежей утренней культуры готовили суспензию на стерильном физиологическом растворе, которая соответствовала стандарту мутности 0,5 по МакФарланду (что эквивалентно  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл). Суспензию растворяли в бульоне Мюллера – Хинтона для получения инокулюма с примерной концентрацией  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. После чего инокулюм (100 мкл) добавляли в лунки стерильных микропланшетов, в которые затем вносили по 100 мкл PEP-36E в различных концентрациях (от 0 до 32 мкг/мл). Контроли: контроль стерильности (только бульон Мюллера – Хинтона, без инокулюма) и контроль роста (бактериальный инокулюм без пептидов). Затем микропланшеты инкубировались в термостате при 37 °С. Через 18–20 ч оценивались величины минимальной подавляющей концентрации (МПК). За МПК считалось минимальное значение концентрации PEP-36E, при котором визуально полностью отсутствовал рост в соответствующей лунке. Исследование с каждой концентрацией PEP-36E в отношении отдельного изолята выполнялось в трех независимых повторениях.

Для скрининговой оценки эффективности PEP-36E *in vivo* была использована мышиная модель летальной генерализованной инфекции. Для моделирования сепсиса со 100 % летальностью мышам линии ICR (CD-1) (самки, средняя масса = 30 г) внутрибрюшинно вводили утреннюю чистую культуру карбапенем-устойчивого изолята *K. pneumoniae* или *A. baumannii* (150 мкл/мышь =  $\sim 6,75 \times 10^8$  КОЕ/мышь). Для получения стандарта мутности бактериальных суспензий, равного 15 по МакФарланду, т.е. приблизительной концентрации бактериальных клеток  $\sim 4,5 \times 10^9$  КОЕ/мл, использовали денситометр DEN-1. PEP-36E вводили через 30 мин после инфицирования, однократно внутрибрюшинно, в объеме 100 мкл, в эмпирической дозе 100 мкг/мышь. Общий объем вводимой жидкости не превышал 250 мкл/мышь. Контрольные группы получали физиологический раствор, 100 мкл. В каждой группе было 12 мышей (n=12), рандомизацию животных на контрольные и экспериментальные группы проводили сразу после инфицирования. Выживаемость оценивали каждые 24 часа в течение 5 дней. Для статистического анализа проводилась оценка функции выживания в методе Каплана – Мейера в программном обеспечении StatPlus v.8. Исследования на лабораторных животных были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Ставропольского государственного медицинского университета.

**Результаты и обсуждение.** РЕР-36Е обладал антибактериальной активностью в отношении карбапенем-устойчивых грамотрицательных бактерий *in vitro* со значениями МПК в диапазоне от 0,5 до 4 мкг/мл. Значения МПК представлены в виде медиан (Ме), первого и третьего квартилей в скобках. МПК для *A. baumannii* (n=4): 0,5 (0,3125–0,5) мкг/мл; *P. aeruginosa* (n=4): 4 (2,5–4) мкг/мл; *K. pneumoniae* (n=8): 2 (1–2) мкг/мл; *E. coli* (n=8): 2 (1–3,5) мкг/мл.

В контрольных группах (получали стерильный физиологический раствор) на обеих экспериментальных моделях генерализованных инфекций через 72 часа после инфицирования выживаемость составила 0 %.

При *A. baumannii*-индуцированном сепсисе у животных, получавших РЕР-36Е, выживаемость составила 58,3 % к концу эксперимента (p = 0,0000410902). В модели инфекции, вызванной *K. pneumoniae*, РЕР-36Е также был эффективен, продемонстрировав выживаемость 66,6 % (p=0,000654817).

Катионные АМП играют важную роль при врожденном иммунитете, являясь первой линией защиты от грибов, вирусов, бактерий и паразитов [4, 5], однако они могут разрушаться пептидазами, что значительно уменьшает их период полувыведе-

ния. *De novo* разработка новых противомикробных препаратов на основе АМП должна быть сфокусирована на сохранении их положительных биологических свойств, снижении издержек синтеза и решении проблем с фармакокинетикой. Ранее было предложено несколько методов, работающих на принципах машинного обучения для *de novo* генерации новых АМП, что позволяет моделировать *in silico* их свойства и предсказывать эффективность [2, 3].

**Заключение.** В ходе работы впервые было показано, что катионный пептид РЕР-36Е обладает антибактериальным эффектом в отношении карбапенем-устойчивых бактерий *in vitro* и *in vivo*. Необходимо дальнейшее исследование свойств РЕР-36Е, так как остаются неизученными фармакокинетика, токсичность и стабильность пептида, что может оказать существенное влияние на его перспективность как кандидата в лекарственные препараты.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

**Финансирование:** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00102, <https://rscf.ru/project/24-25-00102/>

### Литература/References

- Murray C. J., Ikuta K. S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G. [et al.]. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399:629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Torres M. D. T., Melo M. C. R., Crescenzi O., Notomista E., de la Fuente-Nunez C. Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. *Nat. Biomed. Eng*. 2021;6(1):67-75. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00801-1>
- Maasch Jr. M. A., Torres M. D. T., Melo M. C. R., de la Fuente-Nunez C. Molecular de-extinction of ancient antimicrobial peptides enabled by machine learning. *Cell Host. Microbe*. 2023;31(8):1260-1274.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.07.001>
- Zharkova M. S., Orlov D. S., Golubeva O. Y., Chakchir O. B., Eliseev I. E. [et al.]. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics—a novel way to combat antibiotic resistance? *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2019;9(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00128>
- Baturin V. A., Boshyan R. O. Estimation of blood antimicrobial peptide levels in women of reproductive age with pelvic inflammatory disease before and after antibiotic therapy. *Medical News of North Caucasus*. 2021;16(2):159-161. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16035>

Поступила 27.09.2024

### Сведения об авторах:

Болатчиев Альберт Добаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической фармакологии с курсом ДПО; тел.: +79288205551; e-mail: bolatalbert@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2391-9135>

Батурин Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой; тел.: +78652713466; e-mail: prof.baturin@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6892-3552>

Ольшанская Ирина Ивановна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: +79287404075; e-mail: olshair1@yandex.ru

Вартанян Альберт Ашотович, младший научный сотрудник лаборатории фармакологии, тел.: +79624445428; e-mail: albert.vartanyan.1998@mail.ru

Болатчиева Елизавета Юрьевна, ассистент кафедры анатомии им. В. Ю. Первушина, тел.: +79286382353

Диденко Николай Николаевич, ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии; тел.: +78652352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Кумукова Дарина Муратовна, лаборант лаборатории антимикробных пептидов, тел.: +79280322764; e-mail: darinakumukova57@gmail.com

Бекназаров Евгений Эдуардович, студент, тел.: +79187900663; e-mail: yevgenybeknazarov@yandex.ru