

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В БОРЬБЕ С ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Обзор

© 2020 И.Г. Шемякин¹, В.В. Фирстова^{1*}, Н.К. Фурсова¹, И.В. Абаев¹,
С.Ю. Филиппович², С.Г. Игнатов¹, И.А. Дятлов¹

¹ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279 Оболensk, Московская обл., Россия; электронная почта: firstova@obolensk.org

² Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.07.2020

После доработки 14.09.2020

Принята к публикации 14.09.2020

В обзоре приводятся разнообразные подходы в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний. Новым инструментом достижения элиминации только специфических видов бактерий с сохранением остальной части микробиоты могут служить видоспецифические программируемые RNA-содержащие антибиотики, которые открывают возможность создания нового поколения персонализированных терапевтических препаратов, основанных на редактировании микробиома. Рассмотрены возможности геномного редактирования на основе CRISPR-Cas патогенных бактерий. Расширяющиеся знания о молекулярных механизмах врожденных иммунных реакций активно пытаются использовать для индукции противомикробного иммунитета. Однако к очевидным рискам применения адъювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последующим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь четкое представление о механизмах действия специфических соединений и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Рассмотрены эффективные противомикробные препараты – эндолизины бактериофагов для элиминации устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персистеров и биопленок. Представлены новые подходы в материаловедении при конструкции имплантатов с антибактериальными свойствами для преодоления проблемы постоперационных инфекций. Разнообразные наномодификации поверхности имплантатов призваны уменьшить бактериальную обсемененность поверхности. Описаны бактерицидная и фунгицидная активности наномодификаций поверхности серебром, гибридных наноматериалов на основе бор-нитрида, нановолокон и наногальванических процессов на поверхности с оценкой иммуномодулирующей активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: RNA-содержащие антибиотики, CRISPR-Cas система бактерий, гибридные антибиотики, эндолизины, наноповерхности.

DOI: 10.31857/S0320972520110081

ВВЕДЕНИЕ

Сразу же после открытия пенициллина в 1929 г. было выявлено большое число новых бактерицидных соединений, и к середине 60-х гг. было охарактеризовано более 20 видов антибиотиков. Появление устойчивых к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней, в том

числе пан-резистентных изолятов (нечувствительных уже ко всем антибиотикам из всех функциональных классов), поднимает вопросы дальнейшего исследования возбудителей и новых подходов борьбы с патогенами (антибактериальные препараты на основе RNA, гибридные антибиотики, эндолизины бактериофагов и новые наноматериалы).

Принятые сокращения: sRNA – малые некодирующие RNA; ASOs – антисмысловые олигонуклеотиды; QS – Quorum Sensing; TLR – Toll-подобные рецепторы; NOD – Nod-подобные рецепторы; ПГГ – пептидогликангидролазы; АФК – активные формы кислорода; BN – бор-нитридные наноструктуры; РМО – фосфородиамидатные морфолино олигомеры, *phosphorodiamidate morpholino oligomer*; PNA – пептидо-нуклеиновые кислоты, *peptide nucleic acid*; AcrP – белок биосинтеза незаменимых жирных кислот; CPPs – проникающие внутрь клетки пептиды, *cell-penetrating peptide*.

* Адресат для корреспонденции.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ RNA

Антибиотики широкого спектра действия, которые действуют на большой круг возбудителей бактериальных инфекций, грамотрицательных и грамположительных, спасли миллионы человеческих жизней и остаются одним из самых важных классов лекарств в современной медицине. Однако в некоторых ситуациях предпочтительно использование антибиотиков узкого спектра действия — при необходимости уничтожать отдельные виды бактерий в сложном сообществе микробиома человека, что невозможно с помощью антибиотиков широкого спектра действия. К числу уже используемых в настоящее время препаратов узкого спектра относятся колицины [1], недавно разработанные антагонисты фимбрий некоторых патогенных штаммов кишечной палочки [2], видоспецифичные антитела [3] и бактериофаги [4].

Новым инструментом достижения элиминации только специфичных видов бактерий с сохранением остальной части микробиоты могут служить видоспецифические программируемые RNA-содержащие антибиотики, которые открывают возможность создания нового поколения персонализированных терапевтических препаратов, основанных на редактировании микробиома. Они могут быть синтезированы химически и запрограммированы на поражение конкретных видов бактерий. В этом смысле наиболее перспективными направлениями на настоящий момент представляется использование малых некодирующих RNA (sRNA), играющих важную роль в регуляции трансляции у бактерий, а также систем CRISPR-Cas, играющих роль иммунной системы у бактерий и обеспечивающих защиту от мобильных генетических элементов.

Малые некодирующие RNA в качестве антибактериальных препаратов. Разработка антимикробных препаратов на основе RNA в форме коротких антисмысловых олигонуклеотидов (ASOs), которые будут нацелены на ингибирование существенных генов бактерий на уровне RNA, представляет большой научный и практический интерес. Класс регуляторных молекул RNA не является чем-то чужеродным для бактериальных клеток. Малые некодирующие RNA играют существенную роль в регуляции синтеза широкого спектра белков, в том числе факторов вирулентности, кворума, метаболизма углерода, аминокислот и железа. Этот механизм подробно изучен на примере подавления инициации трансляции путем деградации матричных RNA, вызываемой присоединением к ним Hfq-ассо-

циированных sRNA у *Escherichia coli* и *Salmonella* [5]. Мультимерный белок Hfq — это плейотропный регулятор экспрессии бактериальных генов, играющий роль RNA-шаперона, обеспечивая взаимодействие между sRNA и её мишенью на mRNA. Интересно, что эндогенные бактериальные sRNAs имеют достаточно большой размер (~50–400 нуклеотидов), но их «коровый» регион, необходимый для связывания с мишенью, составляет 8–12 нуклеотидов [6]. Экспериментально установлено для *E. coli*, что оптимальная длина ASOs составляет 10–12 оснований [7]. Однако необходимо дополнительно провести эксперименты и на других бактериях, а также изучить побочные эффекты этих препаратов, в том числе возможность ASOs проникнуть в ядро эукариотической клетки и индуцировать повреждение DNA. Современные методы секвенирования RNA позволяют оценить изменение уровней экспрессии mRNA и соотношение отдельных видов или микробных сообществ не только в культуре *in vitro*, но и внутри клетки или ткани эукариотического хозяина [8]. Недавно были опубликованы данные международного исследования RNA-интерактома [9] по расшифровке закономерностей продуктивного спаривания sRNA–mRNA внутри бактериальных клеток, что позволит использовать полученные знания об эндогенных sRNA при дизайне антибактериальных препаратов на основе ASOs. RNA — довольно нестабильные молекулы, поэтому в качестве ASOs предложено использовать модифицированные нуклеиновые кислоты с улучшенной стабильностью и устойчивостью к нуклеазам: заблокированные нуклеиновые кислоты (*locked nucleic acid*, LNA), фосфородиамидатные морфолино олигомеры (*phosphorodiamidate morpholino oligomer*, PMO) и пептидо-нуклеиновые кислоты (*peptide nucleic acid*, PNA). Последние представляют собой комплексы с короткими (<30 аминокислот) пептидами-носителями преимущественно катионной или амфифильной природы [10]. Многие проникающие внутрь клетки пептиды (CPPs, *cell-penetrating peptide*) способны проникать как в бактериальные, так и в эукариотические клетки, что увеличивает их привлекательность в качестве систем доставки соединений против внутриклеточных патогенов. Последовательность ASO рассчитывают таким образом, что он связывается с mRNA важного для жизнедеятельности бактерии гена в области связывания с рибосомой (*ribosome binding site*, RBS), предотвращая присоединение рибосомной субъединицы 30S и, следовательно, синтез белка. Установлено, что sRNA вызывают ингибирование связывания mRNA с 30S субъединицей рибосомы на рассто-

янии до 50 оснований выше стартового кодона. Математические расчёты показали, что теоретически допустимо создать sRNAs для целевого воздействия на выбранные виды бактерий. Впервые этот тип «программируемого RNA-антибиотика» был описан более трех десятилетий назад в виде очень маленьких олигонуклеотидов, атакующих рибосомальную RNA *E. coli* [11], позже было продемонстрировано, что ASOs размером 9–12 олигонуклеотидов репрессировали mRNA белка биосинтеза незаменимых жирных кислот AcrP [12]. Антимикробные препараты на основе ASOs к настоящему времени уже протестированы в экспериментах *in vitro* или *in vivo* на грамотрицательных и грамположительных бактериях родов *Acinetobacter*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* [13].

Микробиом кишечника человека, который играет важную роль в определении статуса здоровья или болезни макроорганизма – самая разнообразная и метаболически вариабельная часть общего микробиома, содержащая ~1000 уникальных для этого сообщества видов бактерий [14]. Приблизительно 10% генов кишечного микробиома являются важными генами, каждый из них имеет 5'-mRNA область, потенциальную мишень ASOs для ингибирования их трансляции. Показано, что наибольшей эффективностью обладают ASOs, комплементарные области стартового кодона и последовательности Шайн–Далгарно. Однако эти области достаточно консервативны у бактерий и не могут служить мишенью при разработке антимикробных препаратов узкоспецифического действия. В качестве альтернативного варианта предложены sRNAs, нацеленные на подавление формирования особенностей во вторичной структуре mRNA, необходимых для оптимальной трансляции [14]. Доставка ASOs в бактериальную клетку – задача, которую необходимо решать при создании антибактериальных препаратов. Оболочки бактерий практически непроницаемы для высокомолекулярных олигомеров, так как пориновые структуры не пропускают молекулы размером более 600 Да. Для доставки ~11-мерных ASOs (≥ 3 кДа) требуется наличие белков-носителей. Важным требованием к таким пептидам является их функциональная нейтральность, чтобы они не вызывали каких-либо стрессов для бактериальных клеток и микробиоты в целом. Кроме того, белки-носители должны доставлять ASOs целенаправленно, с учётом цитоплазматической, мембранной или другой субклеточной локализации экспрессии определенных бактериальных mRNA [15].

К настоящему времени успешно испытаны, в том числе в экспериментах на животных моделях, несколько разных белков-носителей, полученных на основе природных CPPs или природных антимикробных пептидов (табл. 1). Показано, что разные пептиды имеют определенную специфичность – лучше работают либо на грамположительных, либо на грамотрицательных бактериях, что открывает возможности дополнительно использовать этот фактор при создании узкоспецифичных препаратов [16]. Рассматриваются и другие подходы для доставки ASOs в бактериальные клетки: возможность использования внеклеточных везикул, которые описаны у многих видов бактерий как механизм межвидовой коммуникации [17]; использование специфического секреторного белка *Listeria monocytogenes*, который транспортирует RNA этого патогена из бактериальной цитоплазмы в эукариотическую клетку [18]; конструирование фагмид, инкапсулированных в нелитический бактериофаг M13 [19].

Таким образом, существует достаточно доказательств того, что препараты ASOs могут эффективно уничтожить разнообразные бактерии, что продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Тем не менее ещё предстоит ответить на многие фундаментальные вопросы, чтобы эта технология могла быть использована для точечного редактирования микробиома. В частности, пока остаётся открытым вопрос: будут ли эффективны антибактериальные препараты на основе ASOs против клеток с пониженным уровнем метаболизма – персистеров и биоплёнок [20].

CRISPR-Cas система бактерий. Защита бактерий от мобильных генетических элементов, осуществляемая системами CRISPR-Cas, основана на специфичном узнавании чужеродной DNA или RNA за счёт спаривания с короткими (32–35 нуклеотидов) гидовыми RNA, генерируемыми CRISPR-массивом, с последующим разрезанием целевой последовательности нуклеазой, кодируемой генами *cas* [21]. В последние годы машинерия CRISPR-Cas была предложена для создания систем редактирования геномов. Высокая специфичность систем CRISPR-Cas и возможность их нацеливания на гены антибиотикорезистентности обосновывает их использование в качестве новых антимикробных препаратов, позволяющих атаковать непосредственно гены антибиотикорезистентности и нежелательные патогенные бактерии, не затрагивая других представителей микробиома [22]. Гидовые RNA или CRISPR-RNA (crRNA), нацеленные на генетические детерминанты факторов вирулентности, антибиотикорезистентности

Таблица 1. Антибактериальные препараты, разработанные на основе RNA, и механизм их действия

Наименование препарата	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Hfq-ассоциированные sRNA	деградации матричных RNA, вызываемые присоединением к ним Hfq-ассоциированных sRNA	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>	[5]
Пептид-PNA конъюгаты	анти- <i>acpP</i> PNA конъюгаты инактивируют ген <i>acpP</i> , контролирующий синтез жирных кислот	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	[7]
ASO-CPP, CPP-PNA и CPP-PMO конъюгаты	стабилизация и доставка к внутриклеточным мишеням RNA-антибиотиков	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteric</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	[10]
Неионные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу 16S rRNA	селективное ингибирование синтеза белка и бактериального роста	<i>E. coli</i>	[11]
PMO против гена <i>acpP</i>	антибактериальные препараты активны на легкой модели инфекции	<i>Burkholderia cepacia</i>	[14]
sRNAs OmrA и OmrB	Hfq-зависимое ремоделирование структуры RNA ингибирует трансляцию гена фермента дигуанилатциклазы DgcM (ранее: YdaM), участвующего в регуляции формирования биопленки	<i>E. coli</i>	[14]
Анти- <i>gyrA</i> PNA	ингибирование роста бактерий препаратом анти- <i>gyrA</i> PNA <i>in vitro</i> и на модели инфекции у <i>Galleria mellonella</i>	<i>S. pyogenes</i>	[16]
Системы CRISPR-Cas I и II типов	использование систем CRISPR-Cas для селективного уничтожения бактерий	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	[23]
Система CRISPR-Cas с гидовыми RNA против генов β -лактамаз blaSHV-18 или blaNDM-1	специфическое разрезание двунитевой DNA генов <i>blaSHV-18</i> или <i>blaNDM-1</i> ; система доставки – бактериофаг или плаزمид	<i>E. coli</i>	[24]
Система CRISPR-Cas с гидовыми RNA против гена интимина <i>eae</i> энтерогеморрагических эшерихий EHEC	специфическое разрезание двунитевой DNA гена <i>eae</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	[24]
Система CRISPR-Cas, нацеленная на уничтожение плазмид, несущих гены β -лактамаз NDM-1 и CTX-M-15, система доставки – лизогенным бактериофагом	полная элиминация резистентных бактерий из популяции, увеличение чувствительности целевых бактерий к β -лактамам антибиотикам	<i>E. coli</i>	[25]

или на существенные хромосомные гены патогенных бактерий, были разработаны для *E. coli* и *Staphylococcus aureus*. К сожалению, эффективность синтетических crRNA может быть снижена из-за спонтанных точечных мутаций в бактериальных геномах, поэтому необходимо предусмотреть возможность избегать таких эффектов при разработке новых лекарств [23]. В качестве векторов для доставки систем CRISPR-Cas в бактериальные клетки были испытаны фаговые частицы, специфичные для бактерий-мишеней, и конъюгативные плазмиды [24]. Интересный комбинированный подход использования бак-

териофагов и систем CRISPR-Cas позволил осуществить увеличение чувствительности целевых бактерий к β -лактамам антибиотикам и обеспечить полную элиминацию резистентных бактерий из популяции [25]. В последние годы появились сообщения о многообещающих вариантах наноносителей для доставки антимикробных систем в бактериальные клетки, например, хитозан разного молекулярного веса и наночастицы золота. Кроме того, предложено использовать эндогенные системы CRISPR-Cas, доставляя в бактерии-мишени только гидовую RNA [26].

ГИБРИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ

С появлением штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью появилась необходимость разработки новой стратегии терапии инфекционных заболеваний. Одним из таких направлений является разработка гибридов антибиотиков, которые представляют собой два ковалентно связанных соединения с разным механизмом действия. Такой препарат может быть представлен либо комбинацией двух антибиотиков с разным механизмом действия, либо антибиотиком, ковалентно связанным с адьювантом.

Ковалентная связь гибридного антибиотика может быть расщепляемой или нерасщепляемой. В случае расщепляемой связи гибридный антибиотик представляет собой пролекарство, которое биотрансформируется под влиянием ферментов организма в месте действия. Преимуществом такого подхода является активация антибиотика в целевом сайте назначения, что позволяет использовать меньшие концентрации антибиотика. Применение гибридов антибиотиков, содержащих два слитых антибиотика, даёт дополнительные преимущества комбинированной терапии. Сочетание антибиотика с химическим соединением, которое не обладает антимикробным действием, может быть использовано для получения синергетического эффекта. Такие агенты работают, нацеливаясь на различные этапы в общем биохимическом процессе, улучшая поступление и/или подавляя отток антибиотика. Агенты такого рода назвали антибиотическими адьювантами [27]. Антибиотические адьюванты могут быть направлены непосредственно на бактериальную клетку, способствуя усилению действия антибиотика, или на иммунную систему хозяина, активируя определенные звенья иммунитета, что приводит к активной элиминации патогена из организма.

Антибиотические адьюванты, направленные на бактериальную клетку. Действие антибиотических адьювантов, направленное на блокирование основных механизмов устойчивости к антибиотикам у бактерий, можно разделить на:

- а) ингибирование β -лактамаз,
- б) ингибирование эффлюксных насосов,
- в) регуляцию проницаемости мембраны бактерий,
- г) ингибирование патогенности бактерий.

Ингибирование β -лактамаз. Синтез ферментов, способных дезактивировать антибиотики, является одним из механизмов устойчивости, используемых бактериями, чтобы противостоять действию антибиотиков. β -Лактамные антибиотики, первые природные соединения успеш-

но применяемые и впоследствии модифицированные, по-прежнему представляют собой важный класс антибиотиков благодаря их антибактериальной активности и селективности. К ним относятся пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы. Вместе с тем за их появлением на рынке быстро последовало распространение устойчивых штаммов в глобальном масштабе. Механизм действия, с помощью которого работают эти антибиотики, основан на инактивации транспептидаз, необходимых для последней стадии биосинтеза клеточной стенки бактерий. Некоторые бактериальные штаммы продуцируют β -лактамазы, которые разрушают β -лактаманное кольцо, что приводит к потере эффективности антибиотиков, содержащих эту функциональную группу. Для преодоления устойчивости к β -лактамазе применяются две стратегии: разработка устойчивых к β -лактамазе антибиотиков, например цефалоспоринов и карбапенемов, которые устойчивы к гидролизу β -лактамазами, и разработка селективных ингибиторов β -лактамаз, применяемых совместно с β -лактаманым антибиотиком [28]. Выбор ингибитора, который можно комбинировать с определенным β -лактаманым антибиотиком, представляет собой сложный этап, на котором необходимо учитывать ряд требований: а) ингибитор должен защищать антибиотик от ферментативного гидролиза, б) доза ингибитора должна быть достаточной для обеспечения защиты антибиотика от ферментов и в) препарат должен сохранять стабильность и активность.

Комбинация амоксициллина и клавулановой кислоты по-прежнему широко используется в терапии инфекционных заболеваний [29]. Впоследствии в клиническую практику были введены тазобактам и сульбактам. В 2015 г. FDA было одобрено применение авибактама в комбинации с цефтазидимом, которые ингибируют многие клинически значимые лактамазы класса А и С, а также ограниченное количество ферментов класса D, таких как OXA-48 [30]. В 2018 г. для борьбы с мультирезистентными бактериями, такими как *Acinetobacter baumannii*, характеризующимися разнообразием β -лактамаз класса D, были одобрены к применению две новые комбинации ингибиторов карбапенем- β -лактамазы: имипенем-релебактам и меропенем-ваборбактам [31]. Конъюгированный с пептидом РМО был сконструирован для селективного ингибирования экспрессии NDM-1, что снизило минимальную ингибирующую концентрацию меропенема для грамотрицательных бактерий и увеличило выживаемость в модели мышинного сепсиса [32]. Комбинация цефепима с ингибитором β -лактамазы VNRX-5133/VNRX-5133 по-

казала сильную антибактериальную активность в отношении устойчивых к карбапенему *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa* [33].

Ингибирование эффлюксных насосов. Наиболее широко используемой стратегией для борьбы с антибиотикорезистентностью является разработка ингибиторов эффлюксных насосов, которые предназначены для комбинированной терапии со специфическими антибиотиками. Эффлюксные насосы, располагающиеся в клеточной мембране некоторых видов бактерий, после проникновения антибиотика в клетку откачивают его обратно, из-за чего лекарство не может достигнуть необходимой концентрации и уничтожить микроорганизм. В качестве ингибиторов выступают небольшие молекулы, которые способны блокировать функции эффлюксных насосов. Ингибиторы эффлюксных насосов, как правило, не обладают антибактериальной активностью, поэтому эти соединения дополнительно тестируются на синергизм с антибиотиками в различных концентрациях. Высокую эффективность ингибиторы эффлюксных насосов будут проявлять при совместной терапии с антибиотиками классов макролидов, фторхинолонов и тетрациклинов, действие которых проявляется при проникновении внутрь бактерии. На сегодняшний день не зарегистрировано ни одного препарата, ингибирующего эффлюксные насосы, что связано с часто проявляемой ими токсичностью. Тем не менее работы в этом направлении продолжают. Например, соединения карвотацетона, выделенные из *Sphaeranthus africanus*, оказывали сильное антибактериальное действие на *Mycobacterium aurum* и *Mycobacterium bovis* BCG и ингибировали эффлюксные насосы микобактерий, что позволяет их рассматривать, как многообещающий адъювант в терапии туберкулеза или других нетуберкулезных микобактериальных инфекций [34].

Протонофор карбонилцианид м-хлорфенилгидразин также способствовал усилению эффективности антибиотикотерапии бактерий *Enterobacteriaceae* за счёт снижения продукции АТФ и увеличения проницаемости мембран [35].

Регуляция проницаемости мембраны бактерий. Обычно антибиотики, используемые в терапии, оказывают своё антибактериальное действие, поражая соответствующие мишени внутри клетки. Это требует проникновения антибиотика через бактериальную мембрану (мембраны) внутрь клетки. Дополнительная наружная мембрана у грамотрицательных бактерий, которая в основном состоит из полианионных липополисахаридов и поринов, ограничивает проникновение антибиотиков. Как след-

ствие, некоторые антибактериальные препараты проявляют пониженную эффективность при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Известно, что два механизма проникновения антибиотиков через бактериальную стенку зависят от химической природы антибактериального препарата. Первый основан на применении гидрофобных соединений (таких как макролиды и рифампицин), которые пересекают липидный бислой через пассивные транспортные механизмы. Второй используется гидрофильными молекулами (например, β -лактамы, фторхинолоны и фениколовые антибиотики), которые диффундируют через активные транспортные механизмы, используя их способность взаимодействовать с особыми поринами. В этом контексте бактериальная наружная мембрана представляет собой потенциальную мишень, в ряде случаев способную противостоять проникновению антибиотика. Для увеличения способности антибиотика проникать через мембрану могут использоваться адъюванты. В качестве адъювантов такого типа эффективно могут применяться пермеабилитаторы, представляющие собой катионные и амфифильные молекулы или хелаторы, которые, взаимодействуя с полианионными липополисахаридами или захватывая катионы внешнего слоя, дестабилизируют стенку мембраны и таким образом увеличивают вероятность проникновения антибиотика. Примерами пермеабилитаторов наружных мембран являются полимиксины, такие как полимиксин В, колистин, аминокликозиды, катионные пептиды, производные катионной желчной кислоты или полиамины.

Антибиотики, гибридные с сидерофорами, работают по типу «тройного коня». Этот гибридный антибиотик вводит бактерии в заблуждение, чтобы активно транспортироваться в клетку. Сидерофоры – молекулярные соединения, которые выделяют сами бактериальные клетки для обеспечения себя жизненно необходимым железом. Сидерофоры захватывают железо и возвращаются в свою клетку, поглощаясь активными транспортными каналами. Путем мечения антибиотиков хелатирующим железом сидерофором внутриклеточные концентрации лекарственного средства достигают высоких значений благодаря поступлению в клетку через бактериальную систему транспорта железа [36]. При конструировании гибридных антибиотиков, связанных с сидерофором, необходимо принимать во внимание различные аспекты. Например, учитывать уровень сродства к железу при использовании неродного сидерофора, анализировать стабильность препарата, который

должен сохранять стабильность во внеклеточной среде, но высвобождаться внутри клетки благодаря ферментативной активности, и, наконец, поглощение сидерофора не должно быть затруднено.

Разработан препарат, содержащий новый β -лактамазный ингибитор GT-055, конъюгированный с сидерофором цефалоспорином GT-1. GT-055 активен против β -лактамаз класса A, C, D и некоторых классов B. Добавление GT-1 усиливает действие GT-055 против мультирезистентных штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [37]. Показано также, что препарат, содержащий GT-055, конъюгированный с сидерофором цефалоспорином GT-1, характеризовался повышенной активностью в отношении мультирезистентных штаммов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*, включая мутантные штаммы по поринам и эффлюксной системе [38].

Ингибирование патогенности бактерий. В последнее десятилетие появился новый подход, направленный на снижение патогенности бактерий. В отличие от традиционных противомикробных препаратов, которые действуют, убивая бактерии или блокируя рост бактерий, разрабатываемые препараты нового поколения будут направлены на конкретные факторы вирулентности, которые проявляются бактериями только во время инфекционного процесса (табл. 2). Они несущественны для клеточного цикла бактерий, но они важны для проявления патогенности. Снижение вирулентности/патогенности бактерий значительно облегчит их элиминацию из организма компонентами иммунной системы. Ингибирование патогенности/вирулентности бактерий может быть достигнуто различными путями, например, при воздействии на биосинтез цистеина, белки Quorum sensing (QS) и биоплёнки.

Ингибирование биосинтеза цистеина. Важность цистеиновых биосинтетических ферментов варьируется в течение жизненного цикла патогенов: их активность может быть необязательной во время роста *in vitro* или острых инфекций, но становится незаменимой в течение фазы персистенции [39]. Препараты, способные ингибировать биосинтез цистеина, могут иметь более эффективное потенциальное преимущество в борьбе с бактериями-персисторами в организме человека, чем традиционные антибиотики, предотвращая формирование антибиотикоустойчивости [40]. Важная роль биосинтеза цистеина в формировании устойчивости к антибиотикам была выявлена относительно недавно [41]. В этой связи разрабатываются новые гибриды антибиотиков. Например, модификация 37-мерного антимикробного пептида HVCARD

путем включения нового цистеина к его C-концу позволила значительно повысить его антимикробную активность [42]. Для повышения эффективности эрадикации *Helicobacter pylori* был разработан препарат, где N-ацетилцистеин использовали в качестве адьюванта при проведении антибиотикотерапии [43].

Ингибирование белков Quorum Sensing (QS). У многих бактериальных патогенов рост популяции находится под контролем QS, который представляет собой механизм межклеточной коммуникации, контролирующей проявления фенотипа, в том числе вирулентность. Эта система работает благодаря постоянной секреции сигнальных молекул (называемых аутоиндукторами) каждой отдельной бактерией. Для разработки ингибиторов QS синтезируют химические соединения, имитирующие структуры сигнальных молекул. Например, был синтезирован пептид 31, который снижал уровень межклеточных взаимодействий с участием сигнальных пептидов, т.е. ингибировал QS [44].

Антибиоплёночные препараты. По данным статистики 65–80% случаев бактериальных инфекций протекает с образованием биоплёнок, представляющих собой сообщества микроорганизмов. В фазе роста в условиях инфекции бактерии становятся в 10–1000 раз более устойчивыми к антибиотикам. На основе природных пептидов, таких как человеческий кателицидин LL-37 и бычий пептид индолицидин, были получены синтетические катионные пептиды [45]. Эти соединения обладают способностью ингибировать образование биоплёнок, широким спектром активности, а также могут быть использованы в качестве антибиотических адьювантов, усиливая бактерицидное действие антибиотиков, таких как тобрамицин, цефтазидим, имипенем и ципрофлоксацин [46].

В качестве антибиотических адьювантов могут использоваться также пептиды, некоторые из которых оказывают не только антимикробное действие, но и деградируют внеклеточный полимерный матрикс бактериальных биоплёнок (табл. 2). Например, гепсидин 20 может уменьшать массу внеклеточного матрикса *Staphylococcus epidermidis* и изменять его биоплёночную архитектуру, воздействуя на полисахаридный межклеточный адгезин [47]. Антибиоплёночные пептиды могут подавлять гены, участвующие в образовании биоплёнки и транспорте связывающих белков как граммотрицательных, так и грамположительных бактерий [48].

Антибиотические адьюванты, направленные на иммунную систему хозяина. Врождённая иммунная система – это первая линия защиты организма от бактериальных инфекций. В отличие

Таблица 2. Гибридные антибиотики и механизм их действия

Наименование препарата	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Имипенем-релебактам	ингибирование β -лактамаз	<i>A. baumannii</i>	[31]
Меропенем-ваборбактам	ингибирование β -лактамаз	<i>A. baumannii</i>	[31]
Комбинированные цефепим с VNRX-5133	ингибирование β -лактамаз	Enterobacteriaceae и <i>P. aeruginosa</i>	[33]
Гибриды с тобрамицином	ингибирование эффлюксных насосов	<i>P. aeruginosa</i>	[52]
GT-055 в сочетании с сидерофором GT1	усиление проницаемости мембраны бактерий для антибиотиков	<i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> и <i>K. pneumoniae</i>	[37, 38]
Модифицированный 37-мерный антимикробный пептид HBcARD	ингибирование биосинтеза цистеина	<i>A. baumannii</i>	[42]
N-ацетилцистеин	ингибирование биосинтеза цистеина	<i>H. pylori</i>	[43]
Пептид 31	ингибирование QS	<i>P. aeruginosa</i>	[44]
Гепсидин 20	деградация внеклеточного полимерного матрикса бактериальных биоплёнок	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[48]
Синтетические антибиоплёночные пептиды	подавление генов, участвующих в образовании биоплёнки	грамотрицательные и грамположительные бактерии	[48]
Антимикробный пептид LL-37	индукция аутофагии, усиление антимикробного ответа нейтрофилов и подавление синтеза провоспалительных цитокинов и IFN-гамма	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[51]
Тобрамицин, присоединенный к алифатическим углеводородам	селективно индуцируют синтез интерлейкина (IL-8) макрофагами, что усиливает миграцию и активацию лейкоцитов, способствуя эффективной элиминации патогена из организма	<i>P. aeruginosa</i>	[53]

от адаптивной иммунной системы, активирующейся через некоторый промежуток времени, врождённая иммунная система незамедлительно реагирует на патогенные микроорганизмы. Это происходит благодаря наличию паттерн-распознающих рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток, прежде всего макрофагах и дендритных клетках. Паттерн-распознающие рецепторы взаимодействуют со структурами, общими для всех бактерий, в результате чего происходит активация иммунокомпетентной клетки и запуск реакций врождённого иммунитета. Паттерн-распознающие рецепторы делятся на три основные категории: Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR) и Nod-подобные рецепторы (NOD). TLR распознают поверхностные и внутриклеточные белки, липиды, RNA, DNA и другие компоненты бактерий. Связывание бактериальной молекулы с TLR запускает сигнальный каскад активации клетки по MyD88-зави-

симуму и/или MyD88-независимому пути, в результате чего синтезируются провоспалительные цитокины и/или интерфероны типа I. RLRs расположены в цитоплазме и способны связываться с DNA/RNA вирусов и внутриклеточных бактерий. Связывание RLRs с компонентами бактерий/вирусов приводит к активации сигнальных путей эукариотической клетки и запуску синтеза интерферонов I типа. NOD-рецепторы представляют собой большое семейство белков, которые формируют мультипротеиновые комплексы в цитоплазме. Их лиганды способны взаимодействовать с мурамилдипептидом, флагеллином бактерий, а также некоторыми белками грибов и вирусов. В результате такого взаимодействия активируется каспаза и происходит превращение про-IL-1 β в его активную (провоспалительную) форму. Перечисленные выше эффекторные функции врождённого иммунитета способствуют рекрутингу, активации и дифференцировке иммунокомпете-

ных клеток, что в итоге способствует элиминации микроорганизмов главным образом за счёт фагоцитоза.

Давно известно, что некоторые пептиды (менее 50 аминокислот в длину) оказывают иммуномодулирующее действие и способны усиливать антимикробную активность врождённой иммунной системы. Изученность спектра действия и механизмов иммуномодулирующих пептидов позволяет их рассматривать в качестве потенциальных компонентов при конструировании гибридных антибиотиков (табл. 2). Так, например, предварительная обработка растворимыми агонистами TLR, такими как Pam3-CSK4 или MALP2 (TLR-2), полиинозинполицитидиловой кислотой (TLR-3), липополисахаридом (TLR-4) или DNA CpG (TLR-9) усиливала защитные механизмы хозяина против патогена за счёт усиления фагоцитоза [49]. Поскольку липополисахарид токсичен и не может рассматриваться в качестве клинического препарата, были исследованы другие лиганды, такие как монофосфорилипид А и аминокил-глюкозаминидфосфаты, которые показали высокую эффективность в качестве адъювантов [50].

Искусственная стимуляция NOD1 может представлять собой многообещающую стратегию для повышения врождённого иммунитета против бактериальных патогенов особенно во время лечения антибиотиками широкого спектра действия, которое истощает или серьёзно изменяет эндогенную микрофлору. Агонисты NOD2 также усиливают фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и макрофагов брюшины, печени и лёгких. Обработка альвеолярных макрофагов человека мурамилдипептидом NOD2-лиганда индуцирует аутофагию и экспрессию антимикробного пептида LL-37. Активность LL-37 включает усиление антимикробного ответа нейтрофилов и подавление провоспалительных цитокинов и IFN-гамма, повышая защиту от микобактерий [51].

Перспективной парой для создания гибридного антибиотика является тобрамицин. Тобрамицин характеризуется плеiotропным механизмом антибактериального действия: блокирует 30S субъединицу рибосом и тормозит синтез белка, а при высокой концентрации разрушает бактериальную мембрану, вызывая гибель клетки. Гибриды, содержащие тобрамицин, проявляют активность в отношении мультирезистентных штаммов за счёт способности тобрамицина ингибировать эффлюксные каналы [52]. Кроме того, тобрамицин, присоединённый к алифатическим углеводородам, обладает

иммуномодулирующими свойствами: селективно индуцируют хемокиновый интерлейкин (IL-8) в макрофагах. IL-8 – мощный нейтрофильный хемотаксический фактор, вызывающий миграцию и активацию моноцитов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов, что приводит к эффективной элиминации патогена из организма [53].

Молекулярные механизмы врождённых иммунных реакций активно пытаются использовать для разработки новых противомикробных препаратов. Однако к очевидным рискам применения антибиотических адъювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последующим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь чёткое представление о механизмах действия специфических лигандов и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Список гибридных антибиотиков представлен в табл. 2.

ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ

S. aureus является грамположительным оппортунистическим патогеном, который колонизирует 30–50% человеческой популяции. В настоящее время *S. aureus* приобрел устойчивость практически ко всем антибиотикам и считается одной из главных причин внутрибольничных инфекций главным образом из-за широкого распространения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. *S. aureus* способен занимать самые разнообразные экологические ниши благодаря наличию нескольких адаптационных механизмов, в частности, позволяющих избежать иммунного ответа хозяина и пережить воздействие больших доз антибиотиков [54]. Наиболее известными из адаптационных возможностей данной бактерии являются формирование биоплёнок и внутриклеточное сохранение и размножение.

Биоплёнка как способ надклеточной организации прокариот обладает рядом специфических свойств, обеспечивающих толерантность к антимикробным воздействиям на бактериальные клетки. Известно, что бактериальные клеточные патогены в составе биоплёнки имеют более высокую степень вирулентности в сравнении с их планктонными формами, и по меньшей мере 80% инфекций *S. aureus* ассоциировано с биоплёнками [55]. Внедрение *S. aureus* в эукариотические клетки и последующее внутриклеточное сохранение и размножение непосредственно связано с наличием внутриклеточных

компартов с низким рН. Находясь внутри клетки, эти бактерии снижают метаболическую активность и в силу ряда других причин проявляют устойчивость к антибиотикотерапии и воздействию иммунных систем организма-хозяина, что во многом объясняет высокую частоту рецидивирующих инфекций, наблюдаемых у *S. aureus* [56].

Таким образом, новые антибактериальные агенты, активные против биоплёнок, внутриклеточных форм и лекарственно-устойчивых штаммов *S. aureus* являются актуальной насущной потребностью практического здравоохранения (табл. 3). Одним из наиболее продвинутых вариантов новых альтернативных антимикробных агентов, способных эффективно бороться с инфекциями *S. aureus*, выступают пептидогликангидролазы (ПГГ) [57]. ПГГ представляют собой ферменты, способные расщеплять специфические связи внутри пептидогликана бактериальной клеточной стенки, вызывая тем самым бактериальный лизис. Этот активный механизм уничтожения *S. aureus* также действует и на метаболически неактивные персистентные и антибиотикорезистентные бактерии [58]. ПГГ разделяют на несколько классов, прежде всего, по происхождению, но наиболее перспективным вариантом для разработки альтернативных антимикробных агентов являются ПГГ, кодируемые геномом бактериофагов и способные вызывать лизис изнутри инфицированных бактерий-хозяев для освобождения вирионов в конце литического цикла фага. Такие бактериофаговые ПГГ часто называют эндолизинами. При воздействии извне рекомбинантные эндолизины быстро и эффективно убивают грамположительные бактерии, разрушая внешний слой пептидогликана [59]. Основные преимущества эндолизинов заключаются в узком спектре действия, что гарантирует воздействие только на определенные виды бактерий, нетоксичности для эукариотических клеток и низком риске развития резистентности вследствие высокой консервативности пептидогликановых связей, мишеней для эндолизинов [60].

Эндолизины имеют модульную структуру, состоящую из *N*-концевых каталитических доменов и одного *C*-концевого SH3b-подобного субстрат-связывающего домена [61]. Наличие модульной структуры облегчает молекулярную инженерию этих белков. Наиболее распространенная архитектура эндолизинов *S. aureus* содержит *N*-концевую эндопептидазу (Cis-His-зависимую амидогидролазу/пептидазу, SHAP), которая расщепляет пептидную связь d-Ala-Gly, затем следует второй каталитический домен — центрально расположенная амидаза-2, которая

расщепляет *N*-ацетилмурамоил-*L*-аланин амидную связь внутри пептидогликана [62]. Расщепление одной связи, вероятно, приводит к большей доступности других связей в пептидогликане, что объясняет синергизм, наблюдаемый для комбинаций рекомбинантных эндолизинов с различными сайтами расщепления [63].

Известен ряд эндолизинов, способных эффективно разрушать биоплёнку *S. aureus* [64], причём большая их часть имеет структуру, близкую к эндолизину бактериофага LysK [65]. Как правило, данные эндолизины активны против биоплёнок различных клинических штаммов *S. aureus*, но не коагулазонегативных стафилококков [66]. Показано, что в состоянии биоплёнки, так же как и в планктонном состоянии, *S. aureus* не способен формировать устойчивость к эндолизинам [59]. Некоторые эндолизины приводят к деградации биоплёнки *S. aureus* независимо от химического состава внеклеточного матрикса (полисахаридный, DNA или белковый матрикс). Показано, что в ряде случаев происходит полное разрушение полисахаридного матрикса, либо разрушение самого матрикса остаётся неполным, но клетки бактерий всегда оказываются элиминированными [67]. В отличие от антибиотиков, субингибиторные концентрации эндолизинов не индуцируют рост стафилококковой биоплёнки [68].

В биоплёнках стафилококков после обработки эндолизинами не было обнаружено персистирующих бактерий. Выжившие бактерии были чувствительны к эндолизину. Эти результаты согласуются с отсутствием сообщений о бактериях, устойчивых к фаговым эндолизинам, несмотря на многочисленные попытки их отбора [69]. Более того, эндолизины способны элиминировать персистирующие бактерии, предварительно отобранные двумя антибиотиками, рифампицином и цiproфлоксацином [58].

Для эффективного лизиса внутриклеточных *S. aureus* эндолизины должны быть трансдуцированы в эукариотические клетки. Для некоторых эндолизинов проникновение в эукариотическую клетку обеспечивается за счёт собственных свойств, о чем сообщалось для эндолизина PlyC стрептококкового фага [70]. Для эндолизинов *S. aureus* доставка в эукариотическую клетку происходит благодаря слиянию с белковым трансдуцирующим доменом [58]. При этом необходимо учитывать тот факт, что среда в различных компартах эукариотических клеток, таких как цитоплазма или фаголизосомы, варьирует по множеству параметров, таких как рН, ионная сила и осмотическое давление. Это

Таблица 3. Эндолизины бактериофагов и механизм их действия

Наименование препарата или действующего агента	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
CF-301/Contrafect NCT03163446 NRephasin/Intron Biotechnology NCT03089697 P128/Gangagen NCT01746654 Staphefekt/Micros NCT02840955	гидролиз пептидогликана	<i>S. aureus</i>	[60]

создаёт, в свою очередь, различные проблемы для проявления литической активности эндолизинов. Вместе с тем было показано, что химерные эндолизины с белковым трансдуцирующим доменом являются многообещающими антибактериальными агентами, способными эффективно удалять внутриклеточные *S. aureus* [71]. Был продемонстрирован синергизм во внутриклеточных компартментах при комбинировании эндолизинов с различными каталитическими активностями.

Эндолизины бактериофагов, обладают уникальным преимуществом активного и быстрого литического механизма, характеризующегося высокой эффективностью в отношении устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персистеров и биоплёнок [58]. Очевидно, что нативные эндолизины, будучи оптимально приспособленными для выполнения своей природной функции, имеют ряд недостатков с точки зрения использования их как антимикробных агентов. Однако любые изменения естественных структур эндолизинов могут влиять на их активность, причём степень такого влияния зависит от индивидуального белка и типа модификации [72]. Причинами этого могут быть стерическое несоответствие при рецепторной или каталитической активности, изменения в локальном распределении заряда или третичной структуре. Исследования показали, что использование генной инженерии для создания химерных конструкций, несущих функциональные домены различного происхождения, способно приводить к получению эндолизинов с новыми и оптимизированными свойствами [73]. В процессе анализа литической активности химерных эндолизинов была установлена специфика действия функциональных доменов в различных условиях, разработана методология поиска оптимальных комбинаций функциональных доменов. В настоящее время первые рекомбинантные эндолизины проходят клинические испытания как антимикробные агенты против *S. aureus* [60].

НАНОМАТЕРИАЛЫ

В настоящее время наномодифицированные поверхности все более активно используются как бактерицидные и иммуномодулирующие инструменты при переходе к персонализированной медицине и технологиям здоровьесбережения. Значительная доля госпитальных инфекций связана с бактериальной контаминацией медицинских устройств и материалов. Применение биомедицинских имплантатов значительно увеличивает риск заражения организма. Несмотря на то что микробиологическая контаминация постоянно минимизируется современными процедурами стерилизации, часто наблюдаются постоперационные вспышки бактериальных инфекций после установки имплантата. Каждый год более 1000 тонн устройств на основе титана (Ti) имплантируются пациентам [74]. Ti и его сплавы чаще всего используются для ортопедических имплантатов, включая кости и суставы, устройства для фиксации перелома и зубные имплантаты благодаря их прочности, стабильности, высокой коррозионной стойкости (из-за образования тонкого слоя оксида титана), низкого модуля упругости и биосовместимости. Более того, оксид титана обладает остеоиндуктивными свойствами [75]. Две основные проблемы сопровождают операцию по замене поврежденной или больной костной ткани – недостаточная остеоинтеграция и возникновение инфекций. Согласно данным FDA и Medtech Europe, в настоящее время на глобальном рынке представлено более 500 000 видов медицинских устройств [76]. Инвазивные медицинские устройства, включая стационарные и имплантируемые устройства, представляют собой лишь часть этого списка. Так, применение цереброспинальных шунтов и различного типа катетеров во всем мире составляет сотни миллионов [77]. Кроме того, имплантируется более миллиона сердечно-сосудистых электронных устройств и выполняется 10 миллионов процедур имплантации зубов [78].

Согласно данным Arciola et al. [79], в мире используется около миллиарда имплантируемых медицинских устройств, связанных с риском инфицирования, тем не менее интенсивность использования таких устройств растёт с каждым годом.

Разработка и изготовление биосовместимых антибактериальных поверхностей по-прежнему остаётся актуальной задачей, решение которой позволит значительно улучшить качество здравоохранения и жизни человека. Инженерия поверхности является мощным инструментом, который позволяет придать поверхности нужные сочетания физических, химических, механических и биологических характеристик, не затрагивая объёмные свойства материала. Существует четыре основных типа антибактериальных поверхностей, предназначенных для борьбы против возбудителей инфекции. Основными механизмами бактерицидной активности являются: (а) высвобождение бактерицидных агентов, (б) антиадгезия (препятствие сорбции бактерий на поверхности), (в) локальное изменение pH и (г) гибель бактерий при непосредственном контакте бактерий с поверхностью (табл. 4). Модифицированные наночастицами поверхности могут убивать бактерии и грибы за счёт генерации активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА) [75, 80]. АФК и АФА вызывают перекисное окисление липидов цитоплазматической мембраны. Кроме того, они могут вызывать повреждение внутриклеточных белков и нуклеиновых кислот. Идеальные наноповерхности должны обладать бактерицидной и фунгицидной активностями, но при этом быть инертными к клеткам животных и человека и не индуцировать иммунные ответы.

Стратегия на основе высвобождения подразумевает наличие антимикробных агентов, таких как наночастицы металлов различных типов антибиотиков, четвертичных соединений аммония, галогенид-родственных соединений, оксид азота и хитозана. Подход к высвобождению антибиотиков имеет определенные ограничения, такие как краткосрочный антибактериальный эффект, множественная лекарственная устойчивость и, возможно, побочные эффекты. Контролируемый выход металлических ионов трудно смоделировать, потому что выход ионов зависит от концентрации бактерицидного элемента и дополнительных факторов, таких как состояние агломерации металла, шероховатости поверхности и кинетики поверхностного окисления [81]. Недавние исследования чётко показали отсутствие прямой корреляции между бактерицидным ионным выщелачиванием и антибактериальными свойствами [82].

Успехи в области бионанотехнологий открывают новые возможности в науке, биотехнологии и медицине. Наличие бактерицидной активности у наночастиц серебра является важной особенностью для борьбы с патогенными микроорганизмами. Наноматериалы на основе серебра оказывают свой бактерицидный эффект преимущественно за счёт высвобождения ионов серебра (в чистом виде или в комплексе) с последующим увеличением проницаемости мембран, потерей протонной движущей силы, что приводит к потере энергии клеткой и оттоку фосфатов, к утечке клеточного содержания и нарушению репликации DNA. В настоящее время наночастицы серебра рассматриваются как альтернатива антибиотикам, поэтому они активно изучаются как бактерицидные агенты. Ионная имплантация серебра и платины на тонкий слой оксида титана приводит к увеличению бактерицидной активности и улучшению остеоинтеграции имплантата [75]. Низкая цитотоксичность наночастиц серебра имеет большое значение для приживления имплантатов, имеющих модифицированную наночастицами поверхность. Для понижения концентрации серебра используются наноиголки на поверхности с последующей их модификацией наночастицами Ag. Такой способ получения покрытия приводит к высокой бактерицидной активности при низкой концентрации серебра [75].

Новые гибридные наноматериалы являются ключевыми компонентами современных биоматериалов следующего поколения (табл. 4). Их уникальные свойства определяются синергетическими эффектами различных наноконпонентов. В последние годы бор-нитридные наноструктуры (BN) находятся в центре внимания благодаря их использованию при синтезе сверхлегких металлов и новых керамических поверхностей, полимеров с улучшенной теплопроводностью и механической прочностью, прозрачных супергидрофобных плёнок, при создании новых систем доставки лекарств и многим другим эффективным применениям [83]. Наноматериалы BN также используются для разработки передовых гибридных наноструктур. Интерес к BN обусловлен их уникальными физико-химическими свойствами, которые включают высокую гидрофобность, тепло- и электроизоляцию, стойкость к окислению, антиокислительную способность, теплопроводность, высокую химическую стабильность, механическую прочность и способность к накоплению водорода. Они также используются в качестве антибактериальных агентов, защитных покрывающих агентов, смазывающих веществ, агентов для бор-нейтронозахватной терапии, наноносители-

лей для доставки лекарств и для рецепторной фазы в хемосенсорах [84]. Прямое связывание целевых лигандов или биологически активных молекул к BN наноматериалам затруднено из-за присущей данным материалам гидрофобности. Для преодоления данной проблемы могут быть использованы металлические линкеры, такие как наночастицы золота или серебра (NP) [85]. Другие перспективные приложения BN наноматериалов могут быть применены при изготовлении квантовых электронных устройств [86] и носителей катализатора. Наногриды Ag/BN также представляют большой интерес как фотокатализаторы и молекулярные зондовые сенсоры [87], помимо использования в качестве антибактериальных средств [88]. Использование сложных наноструктур в качестве бактерицидного элемента является перспективным и быстро развивающимся направлением (табл. 4). Однако известно, что Ag-NP легко агрегируются. Это приводит к ухудшению их химических свойств и потере антибактериальной активности [89]. Использование наночастиц нитрида бора может не только помочь преодолеть эту проблему, но также будет способствовать увеличению антимикробной активности по сравнению с другими наносоединениями [90].

Изучение и разработка новых материалов с бактерицидной активностью интенсивно развиваются в настоящее время. «Материалы будущего» должны обладать биосовместимостью и антибактериальной активностью [91]. Биодegradуемые нановолокна являются перспективными кандидатами «материалов будущего». Они пропускают кислород, но предотвращают проникновение микроорганизмов. Такие материалы перспективны для обработки раневых поверхностей. Однако для повышения эффективности защиты раны от инфекции нановолокна должны проявлять высокую антибактериальную активность. Для увеличения антибактериальной активности нановолокон используют несколько стратегий. Одна из них – растворение бактерицидных агентов в смеси, применяемой для получения химических нановолокон (табл. 4). Эта простая стратегия позволяет загрузить большое количество бактерицидного агента, который может выйти в окружающую среду в течение небольшого промежутка времени, вызвав кратковременный антибактериальный эффект [92]. Применение наночастиц на основе гидроксипатита [93] – более сложный метод, но нагрузка бактерицидным агентом при таком подходе низкая. Применение хитозана, не обладающего бактерицидной активностью, с последующей иммобилизацией на нем антибактериальных агентов показывает высокую

бактерицидную активность. Однако и при таком подходе наблюдается кратковременный бактерицидный эффект [94]. В настоящее время ведутся поиски систем с пролонгированным бактерицидным действием. Весьма интересным направлением является разработка биодegradуемых нанополимеров, модифицированных антибиотиками. Такие полимеры обладают высокой бактерицидной активностью и пролонгированным действием [95].

Наночастицы на основе сульфидов и оксидов металлов (Ag_2S , CuS , FeS , диоксид титана, оксид серебра, оксид цинка и др.), а также поверхности, легированные металлами, оксидами и сульфидами металлов, активно используются для подавления болезнетворной микрофлоры [96]. Однако до сих пор остаются интригующими вопросы: можно ли обеспечить антибактериальную активность только за счёт наногальванического эффекта или добиться синергетического эффекта за счёт сочетания наногальванического эффекта и высвобождения ионов бактерицидов. Предварительные исследования указывают на возможность бактерицидного действия за счёт протекания наногальванических реакций на поверхности [97].

Следует учитывать, что в дополнение к риску бактериальных инфекций, существует также риск грибковой инфекции [98]. Исследование фундаментальных взаимодействий между наночастицами и клетками грибов является ключевым в определении судьбы и поведения наноматериалов, разработанных для применения противомикробных препаратов. Важно отметить, что присутствие ионов Ag, образованных наномодифицированными поверхностями, усиливает действие противогрибкового антибиотика амфотерицина В [99]. Таким образом, имплантаты с включением наномодифицированных ионов Ag и загруженные смесью антибиотиков обеспечивают инновационные биоконструкции, которые одинаково эффективны против бактериальных и грибковых возбудителей. Поэтому комплексная оценка бактерицидной, фунгицидной и иммуномодулирующей активности новых сложно организованных поверхностей является важной задачей для снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Бактерицидная активность наномодифицированных поверхностей интенсивно изучается в нашей стране с использованием всевозможных способов модификации: лазерное нано- и микротекстурирование поверхностей для ухудшения смачивания, придание наношипидной топографии, повреждающей бактериальные мембраны, создание поверхностного гетерослоя из цитотоксичных наночастиц [100].

Таблица 4. Бактерицидные наноматериалы и механизм их действия

Наименование препарата или действующего агента	Механизм действия	Бактерии	Ссылки
Наночастицы на основе металлов, поверхности, легированные металлами, оксидами металлов и сульфидами металлов	АФК и прямое ингибирование ферментов, разрушение клеточной стенки и цитоплазматической мембраны	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[96]
Ag+Pt	АФК и прямое ингибирования ферментов	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[75]
VN	наношпидовидная топография, генерация АФК	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[85]
Нановолокна (модифицированные антибиотиком или бактерицидным агентом)	антибиотик, бактерицидный агент	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[95]
Pt-Fe на подложке TiCaPCON	наногальваника	штаммы, устойчивые к антибиотикам	[97]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ – ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НАПРАВЛЕНИЯ

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекций является важной глобальной проблемой; назрела необходимость разработки альтернативных инновационных антибактериальных препаратов. Перспективным направлением создания таких препаратов является использование синтетических некодирующих RNA (sRNA) и гидовых CRISPR-Cas-ассоциированных RNA (crRNA). Оба этих типа RNA могут быть нацелены на инактивацию эпидемически значимых в настоящее время генетических детерминант антибиотикорезистентности. Используемая методология позволяет одновременно программировать инактивацию несколько мишеней, что повышает степень эффективности новых антибактериальных препаратов. Достижения в области изучения sRNA и систем CRISPR-Cas на настоящем этапе позволяют рассматривать их в качестве новых классов антимикробных препаратов, которые открывают возможности не только для лечения инфекций, вызванных MDR-патогенами, но и для изучения микробных консорциумов и контроля промышленных ферментаций. Расширяющиеся знания о молекулярных механизмах врождённых иммунных реакций активно пытаются использовать для разработки новых противомикробных препаратов. Однако к очевидным рискам применения антибиотических адьювантов, направленных на активацию компонентов иммунной системы хозяина, относятся возможное развитие аутоиммунного состояния с последую-

щим повреждением органов. Поэтому необходимо иметь чёткое представление о механизмах действия специфических лигандов и сигнальных молекул, используемых в качестве компонентов гибридного антибиотика. Весьма перспективным направлением можно считать эндозимозы бактериофагов как эффективный противомикробный препарат против устойчивых к антибиотикам бактерий, метаболически неактивных персисторов и биоплёнок. Наряду с разработкой новых типов антибиотиков необходима комплексная оценка бактерицидной, фунгицидной и иммуномодулирующей активности новых сложно организованных наноповоротностей (в том числе и модифицированных антибиотиками), что является важной задачей для снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 31 октября 2019 г. № 075-15-2019-1671). Работа С.Г. Игнатова выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Работа С.Ю. Филиппович выполнена в рамках госзадания 0104-2019-0024 для ФИЦ биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavaret, D. (2007) Colicin biology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 158-229, doi: 10.1128/MMBR.00036-06.
- Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., Janetka, J. W., Remaut, H., Gordon, J. I., and Hultgren, S. J. (2017) Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist, *Nature*, **546**, 528-532, doi: 10.1038/nature22972.
- Cattoir, V., and Felden, B. (2019) Future antibacterial strategies: from basic concepts to clinical challenges, *J. Infect. Dis.*, **220**, 350-360, doi: 10.1093/infdis/jiz134.
- Hesse, S., and Adhya, S. (2019) Phage therapy in the twenty-first century: facing the decline of the antibiotic era; is it finally time for the age of the phage? *Annu. Rev. Microbiol.*, **73**, 155-174, doi: 10.1146/annurev-micro-090817-062535.
- Hör, J., Matera, G., Vogel, J., Gottesman, S., Storz, G. (2020) Trans-acting small RNAs and their effects on gene expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, *EcoSal. Plus*, **9**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0030-2019.
- Gorski, S. A., Vogel, J., and Doudna, J. A. (2017) RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 215-228, doi: 10.1038/nrm.2016.174.
- Goltermann, L., Yavari, N., Zhang, M., Ghosal, A., and Nielsen, P. E. (2019) PNA length restriction of antibacterial activity of peptide-PNA conjugates in *Escherichia coli* through effects of the inner membrane, *Front. Microbiol.*, **10**, 1032, doi: 10.3389/fmicb.2019.01032.
- Nuss, A. M., Beckstette, M., Pimenova, M., Schmöhl, C., Opitz, W., Pisano, F., Heroven, A. K., and Dersch, P. (2017) Tissue dual RNA-seq allows fast discovery of infection-specific functions and riboregulators shaping host-pathogen transcriptomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E791-E800, doi: 10.1073/pnas.1613405114.
- Melamed, S., Adams, P. P., Zhang, A., Zhang, H., and Storz, G. (2020) RNA-RNA interactomes of ProQ and Hfq reveal overlapping and competing roles, *Mol. Cell*, **77**, 411-425.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.022.
- Xue, X. Y., Mao, X. G., Zhou, Y., Chen, Z., Hu, Y., Hou, Z., Li, M.-K., Meng, J.-R., and Luo, X.-X. (2018) Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases, *Nanomedicine*, **14**, 745-758, doi: 10.1016/j.nano.2017.12.026.
- Jayaraman, K., McParland, K., Miller, P., and Ts'o, P. O. (1981) Selective inhibition of *Escherichia coli* protein synthesis and growth by nonionic oligonucleotides complementary to the 3' end of 16S rRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1537-1541, doi: 10.1073/pnas.78.3.1537.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body, *PLoS Biol.*, **14**, e1002533, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Daly, S. M., Sturge, C. R., Marshall-Batty, K. R., Felder-Scott, C. F., Jain, R., Geller, B. L., and Greenberg, D. E. (2018) Antisense inhibitors retain activity in pulmonary models of *Burkholderia* infection, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 806-814, doi: 10.1021/acscinfecdis.7b00235.
- Hoekzema, M., Romilly, C., Holmqvist, E., and Wagner, E. G. H. (2019) Hfq-dependent mRNA unfolding promotes sRNA-based inhibition of translation, *EMBO J.*, **38**, e101199, doi: 10.15252/embj.2018101199.
- Kannaiah, S., Livny, J., and Amster-Choder, O. (2019) Spatiotemporal organization of the *E. coli* transcriptome: translation independence and engagement in regulation, *Mol. Cell*, **76**, 574-589.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.013.
- Barkowsky, G., Lemster, A. L., Pappesch, R., Jacob, A., Krüger, S., Schröder, A., Kreikemeyer, B., and Patenge, N. (2019) Influence of different cell-penetrating peptides on the antimicrobial efficiency of PNAs in *Streptococcus pyogenes*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **18**, 444-454, doi: 10.1016/j.omtn.2019.09.010.
- Lee, H. J. (2019) Microbe-host communication by small RNAs in extracellular vesicles: vehicles for transkingdom RNA transportation, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1487, doi: 10.3390/ijms20061487.
- Hansen, A. M., Bonke, G., Larsen, C. J., Yavari, N., Nielsen, P. E., and Franzyk, H. (2016) Antibacterial peptide nucleic acid-antimicrobial peptide (PNA-AMP) conjugates: antisense targeting of fatty acid biosynthesis, *Bioconjug. Chem.*, **27**, 863-867, doi: 10.1021/acs.bioconjugchem.6b00013.
- Bernheim, A. G., Libis, V. K., Lindner, A. B., and Wintermute, E. H. (2016) Phage-mediated delivery of targeted sRNA constructs to knock down gene expression in *E. coli*, *J. Vis. Exp.*, **109**, 53618, doi: 10.3791/53618.
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., and Zinkernagel, A. (2019) Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 441-448, doi: 10.1038/s41579-019-0196-3.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 67-78, doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
- Greene, A. C. (2018) CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense, *Trends Biotechnol.*, **36**, 127-130, doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.021.
- Bikard, D., and Barrangou, R. (2017) Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials, *Curr. Opin. Microbiol.*, **37**, 155-160, doi: 10.1016/j.mib.2017.08.005.
- Citorik, R. J., Mimee, M., and Lu, T. K. (2014) Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1141-1145, doi: 10.1038/nbt.3011.
- Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., and Qimron, U. (2015) Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7267-7272, doi: 10.1073/pnas.1500107112.
- Parmeciano Di Noto, G., Molina, M. C., and Quiroga, C. (2019) Insights into non-coding RNAs as novel antimicrobial drugs, *Front. Genet.*, **10**, 57, doi: 10.3389/fgene.2019.00057.
- Wright, G. D. (2016) Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance, *Trends Microbiol.*, **24**, 862, doi: 10.1016/j.tim.2016.07.008.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., and Spencer, J. (2019) β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century, *J. Mol. Biol.*, **431**, 3472-3500, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- Papp-Wallace, K. M. (2019) The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of gram-negative bacterial infections, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **20**, 2169-2184, doi: 10.1080/14656566.2019.1660772.
- Ehmann, D. E., Jahić, C. H., Ross, P. L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., Walkup, G. K., and Fisher, S. L. (2012) Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 11663-11668, doi: 10.1073/pnas.1205073109.

31. Zhanel, G. G., Lawrence, C. K., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., et al. (2018) Imipenem-relebactam and meropenem-vaborbactam: two novel carbapenem- β -lactamase inhibitor combinations, *Drugs*, **78**, 65-98, doi: 10.1007/s40265-017-0851-9.
32. Sully, E. K., Geller, B. L., Li, L., Moody, C. M., Bailey, S. M., et al. (2017) Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomer (PPMO) restores carbapenem susceptibility to NDM-1-positive pathogens *in vitro* and *in vivo*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 782-790, doi: 10.1093/jac/dkw476.
33. Mo, Y., Lorenzo, M., Farghaly, S., Kaur, K., and Housman, S. T. (2019) What's new in the treatment of multidrug-resistant gramnegative infections? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **93**, 171-181, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.007.
34. Tran, H. T., Solnier, J., Pferschy-Wenzig, E. M., Kunert, O., Martin, L., et al. (2020) Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of carvotacetones from *Sphaeranthus africanus* against mycobacteria, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 390, doi: 10.3390/antibiotics9070390.
35. Osei Sekyere, J., and Amoako, D. G. (2017) Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae, *Front. Microbiol.*, **8**, 228, doi: 10.3389/fmicb.2017.00228.
36. Negash, K. H., Norris, J. K. S., and Hodgkinson, J. T. (2019) Siderophore-antibiotic conjugate design: new drugs for bad bugs? *Molecules*, **24**, 3314, doi: 10.3390/molecules24183314.
37. Tonziello, G., Caraffa, E., Pinchera, B., Granata, G., and Petrosillo, N. (2019) Present and future of siderophore-based therapeutic and diagnostic approaches in infectious diseases, *Infect. Dis. Rep.*, **11**, doi: 10.4081/idr.2019.8208.
38. Nguyen, L. P., Pinto, N. A., Vu, T. N., Lee, H., Cho, Y. L., Byun, J.-H., D'Souza, R., and Yong, D. (2020) *In vitro* activity of a novel siderophore-cephalosporin, GT-1 and serine-type β -lactamase inhibitor, GT-055, against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter* spp. panel strains, *Antibiotics (Basel)*, **9**, 267, doi: 10.3390/antibiotics9050267.
39. Turnbull, A. L., and Surette, M. G. (2008) L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Microbiology*, **154**, 3410-3419, doi: 10.1099/mic.0.2008/020347-0.
40. Huber, A., Hajdu, D., Bratschun-Khan, D., Gáspári, Z., Varbanov, M., Philippot, S., et al. (2018) New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: a cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176, *Sci. Rep.*, **8**, 1751, doi: 10.1038/s41598-018-20002-2.
41. Turnbull, A. L., and Surette, M. G. (2010) Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*, *Res. Microbiol.*, **161**, 643-650, doi: 10.1016/j.resmic.2010.06.004.
42. Chen, H. L., Su, P. Y., Kuo, S. C., Lauderdale, T. Y., and Shih, C. (2018) Adding a C-terminal cysteine (CTC) can enhance the bactericidal activity of three different antimicrobial peptides, *Front. Microbiol.*, **9**, 1440, doi: 10.3389/fmicb.2018.01440.
43. Fontes, L. E. S., Martimbianco, A. L. C., Zanin, C., and Riera, R. (2019) N-acetylcysteine as an adjuvant therapy for *Helicobacter pylori* eradication, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD012357, doi: 10.1002/14651858.CD012357.pub2.
44. Schütz, C., and Empting, M. (2018) Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers, *Beilstein J. Org. Chem.*, **14**, 2627-2645, doi: 10.3762/bjoc.14.241.
45. Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E. C. W., Rehm, B. H. A., and Hancock, R. E. W. (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation, *Infect. Immun.*, **76**, 4176-4182, doi: 10.1128/iai.00318-08.
46. Refeuveille, F., de la Fuente-Núñez, C., Mansour, S., and Hancock, R. E. W. (2014) A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 5363-5371, doi: 10.1128/aac.03163-14.
47. Brancatisano, F. L., Maisetta, G., Di Luca, M., Esin, S., Bottai, D., Bizzarri, R., Campa, M., and Batoni, G. (2014) Inhibitory effect of the human liver-derived antimicrobial peptide hepcidin 20 on biofilms of polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-positive and PIA-negative strains of *Staphylococcus epidermidis*, *Biofouling*, **30**, 435-446, doi: 10.1080/08927014.2014.888062.
48. Pletzer, D., Coleman, S. R., and Hancock, R. E. (2016) Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare, *Curr. Opin. Microbiol.*, **33**, 35-40, doi: 10.1016/j.mib.2016.05.016.
49. Ribes, S., Adam, N., Ebert, S., Regen, T., Bunkowski, S., Hanisch, U.-K., and Nau, R. (2010) The viral TLR3 agonist poly(I:C) stimulates phagocytosis and intracellular killing of *Escherichia coli* by microglial cells, *Neurosci. Lett.*, **482**, 17-20, doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.078.
50. Mata-Haro, V., Cekic, C., Martin, M., Chilton, P. M., Casavella, C. R., and Mitchell, T. C. (2007) The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4, *Science*, **316**, 1628-1632, doi: 10.1126/science.1138963.
51. Juárez, E., Carranza, C., Hernández-Sánchez, F., León-Contreras, J. C., Hernández-Pando, R., et al. (2012) NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans, *Eur. J. Immunol.*, **42**, 880-889, doi: 10.1002/eji.201142105.
52. Gorityala, B. K., Guchhait, G., Goswami, S., Fernando, D. M., Kumar, A., Zhanel, G. G., and Schweizer, F. (2016) Hybrid antibiotic overcomes resistance in *P. aeruginosa* by enhancing outer membrane penetration and reducing efflux, *J. Med. Chem.*, **59**, 8441-8455, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00867.
53. Laselva, O., Stone, T. A., Bear, C. E., and Deber, C. M. (2020) Anti-infectives restore ORKAMBI® rescue of F508del-CFTR function in human bronchial epithelial cells infected with clinical strains of *P. aeruginosa*, *Biomolecules*, **10**, 334, doi: 10.3390/biom10020334.
54. Malachowa, N., and DeLeo, F. R. (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*, *Cell Mol. Life Sci.*, **67**, 3057-3071, doi: 10.1007/s00018-010-0389-4.
55. James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J. W., and Stewart, P. S. (2008) Biofilms in chronic wounds, *Wound Rep. Regen.*, **16**, 37-44, doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x.
56. Leimer, N., Rachmuhl, C., Palheiros Marques, M., Bahlmann, A. S., Furrer, A., et al. (2016) Nonstable *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalization, *J. Infect. Dis.*, **213**, 305-313, doi: 10.1093/infdis/jiv388.
57. Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S., and Donovan, D. M. (2012) Endolysins as antimicrobials, *Adv. Virus Res.*, **83**, 299-365, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4.
58. Nakamura, T., Kitana, J., Fujiki, J., Takase, M., Iyori, K., Simoike, K., and Iwano, H. (2020) Lytic activity of polyvalent staphylococcal bacteriophage PhiSA012 and its

- endolysin Lys-PhiSA012 against antibiotic-resistant staphylococcal clinical isolates from canine skin infection sites, *Front. Med.*, **7**, 234, doi: 10.3389/fmed.2020.00234.
59. Schmelcher, M., Donovan, D. M., and Loessner, M. J. (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials, *Future Microbiol.*, **7**, 1147-1171, doi: 10.2217/fmb.12.97.
 60. Gerstmanns, H., Criel, B., and Briers, Y. (2018) Synthetic biology of modular endolysins, *Biotechnol. Adv.*, **36**, 624-640, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009.
 61. Schmelcher, M., Tchang, V. S., and Loessner, M. J. (2011) Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity, *Microb. Biotechnol.*, **4**, 651-662, doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00263.x.
 62. Becker, S. C., Foster-Frey, J., and Donovan, D. M. (2008) The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA, *FEMS Microbiol. Lett.*, **287**, 185-191, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01308.x.
 63. Gutierrez, D., Fernandez, L., Martinez, B., Ruas-Madiedo, P., Garcia, P., and Rodriguez, A. (2017) Real-time assessment of *Staphylococcus aureus* biofilm disruption by phage-derived proteins, *Front. Microbiol.*, **8**, 1632, doi: 10.3389/fmicb.2017.01632.
 64. Freitas, A. I., Vasconcelos, C., Vilanova, M., and Cerca, N. (2014) Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms, *J. Basic Microbiol.*, **54**, 750-757, doi: 10.1002/jobm.201200603.
 65. Melo, L. D. R., Brandão, A., Akturk, E., Santos, S. B., and Azeredo, J. (2018) Characterization of a new *Staphylococcus aureus* kayvirus harboring a lysin active against biofilms, *Viruses*, **10**, 182, doi: 10.3390/v10040182.
 66. Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., and García, P. (2014) Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5, *PLoS One*, **9**, e107307, doi: 10.1371/journal.pone.0107307.
 67. Kaplan, J. B. (2011) Antibiotic-induced biofilm formation, *Int. J. Artif. Organs*, **34**, 737-751, doi: 10.5301/ijao.5000027.
 68. Fischetti, V. A. (2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 393-400, doi: 10.1016/j.mib.2008.09.012.
 69. Shen, Y., Barros, M., Vennemann, T., Gallagher, D. T., Yin, Y., et al. (2016) A bacteriophage endolysin that eliminates intracellular streptococci, *Elife*, **5**, e13152, doi: 10.7554/eLife.13152.
 70. Röhrig, C., Huemer, M., Lorge, D., Luterbacher, S., Phothaworn, P., et al. (2020) Targeting hidden pathogens: cell-penetrating enzymatics eradicate intracellular drug-resistant *Staphylococcus aureus*, *mBio*, **11**, e00209-20, doi: 10.1128/mBio.00209-20.
 71. Olsen, N. M. C., Thiran, E., Hasler, T., Vanzielegem, T., Belibasakis, G. N., Mahillon, J., Loessner, M. J., and Schmelcher, M. (2018) Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase, *Viruses*, **10**, 438, doi: 10.3390/v10080438.
 72. Hjelm, L. C., Nilvebrant, J., Nygren, P. A., Nilsson, A. S., and Seijsing, J. (2019) Lysis of staphylococcal cells by modular lysin domains linked via a non-covalent barnase-barstar interaction bridge, *Front. Microbiol.*, **10**, 558, doi: 10.3389/fmicb.2019.00558.
 73. Verbree, C. T., Datwyler, S. M., Meile, S., Eichenseher, F., Donovan, D. M., Loessner, M. J., and Schmelcher, M. (2017) Corrected and republished from: identification of peptidoglycan hydrolase constructs with synergistic staphylolytic activity in cow's milk, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e02134-17, doi: 10.1128/AEM.02134-17.
 74. Thukkaram, M., Cools, P., Nikiforov, A., Rigole, P., Coenye, T., et al. (2020) Antibacterial activity of a porous silver doped TiO₂ coating on titanium substrates synthesized by plasma electrolytic oxidation, *Appl. Surf. Sci.*, **500**, 144235, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144235.
 75. Ponomarev, V. A., Orlov, E. A., Malikov, N. A., Tarasov, Y. V., Sheveyko, A. N., et al. (2020) Ag(Pt) nanoparticles-decorated bioactive yet antibacterial Ca- and P-doped TiO₂ coatings produced by plasma electrolytic oxidation and ion implantation, *Appl. Surf. Sci.*, **516**, 146068, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.146068.
 76. Feldman, M. D., Petersen, A. J., Karliner, L. S., and Tice, J. A. (2008) Who is responsible for evaluating the safety and effectiveness of medical devices? The role of independent technology assessment, *J. Gen. Intern. Med.*, **23**, 57-63, doi: 10.1007/s11606-007-0275-4.
 77. McIntyre, W. F., and Healey, J. S. (2017) Cardiac implantable electronic device infections: from recognizing risk to prevention, *Heart Rhythm.*, **14**, 846-847, doi: 10.1016/j.hrthm.2017.03.027.
 78. Andersen, O. Z., Offermanns, V., Sillassen, M., Almtoft, K. P., Andersen, I. H., et al. (2013) Accelerated bone in growth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants, *Biomaterials*, **34**, 5883-5890, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.031.
 79. Arciola, C. R., Campoccia, D., and Montanaro, L. (2018) Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion, *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 397-409, doi: 10.1038/s41579-018-0019-y.
 80. Mukherjee, K., Acharya, K., Biswas, A., and Jana, N. R. (2020) TiO₂ nanoparticles co-doped with nitrogen and fluorine as visible light-activated antifungal agents, *ACS Appl. Nano Mater.*, **3**, 2016-2025, doi: 10.1021/acsanm.0c00108.
 81. Atay, H. Y., and Celik, E. (2017) Investigations of antibacterial activity of chitosan in the polymeric composite coatings, *Prog. Org. Coat.*, **102**, 194-200, doi: 10.1016/j.porgcoat.2016.10.013.
 82. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Shvindina, N. V., Zhitnyak, I. Y., Gloushankova, N. A., et al. (2017) Approaches for controlled Ag⁺ ion release: influence of surface topography, roughness, and bactericide content, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 4259-4271, doi: 10.1021/acsami.6b15096.
 83. Kalmantaeva, O. V., Firstova, V. V., Grishchenko, N. S., Rudnitskaya, T. I., Potapov, V. D., and Ignatov, S. G. (2020) Antibacterial and immunomodulating activity of silver nanoparticles in tuberculosis models on experimental mice, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 226-232, doi: 10.1134/S0003683820020088.
 84. Weng, Q., Wang, X., Bando, Y., and Golberg, D. (2016) Functionalized hexagonal boron nitride nanomaterials: emerging properties and applications, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 3989-4012, doi: 10.1039/C5CS00869G.
 85. Emanet, M., Sen, Ö., Taşkin, I. Ç., and Çulha, M. (2019) Synthesis, functionalization, and bioapplications of two-dimensional boron nitride nanomaterials, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 363, doi: 10.3389/fbioe.2019.00363.
 86. Han, A., Li, X., Huang, B., Tsoi, J. K.-H., Matinlinna, J. P., Chen, Z., and Deng, D. M. (2016) The effect of titanium implant surface modification on the dynamic process of initial microbial adhesion and biofilm formation, *Int. J. Adhes. Adhes.*, **69**, 125-132.
 87. Huang, H., Chang, Y., Lai, M., Lin, C., Lai, C., and Shieh, T. (2010) Antibacterial TaN-Ag coatings on titanium dental implants, *Surf. Coat. Technol.*, **205**, 1636-1641, doi: 10.1016/j.surfcoat.2010.07.096.
 88. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Kiryukhantsev-Korneev, Ph. V., Anisimova, N. Y., Gloushankova, N. A.,

- Zhitnyak, I. Y., Benesova, J., Amler, E., and Shtansky, V. D. (2015) Two approaches to form antibacterial surface: doping with bactericidal element and drug loading, *Appl. Surf. Sci.*, **330**, 339-350, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.12.119.
89. Carvalho, I., Henriques, M., Oliveira, J. C., Alves, C. F. A., Piedade, A. P., and Carvalho, S. (2013) Influence of surface features on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Ag-TiCN thin films, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **14**, 035009, doi: 10.1088/1468-6996/14/3/035009.
90. Bai, L. (2015) Nanostructured titanium-silver coatings with good antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by one-step magnetron sputtering, *Appl. Surf. Sci.*, **355**, 32-44, doi: 10.1016/j.apsusc.2015.07.064.
91. Koci, K., Mateju, K., Obalova, L., Krejčíková, S., Lacny, Z., Placha, D., Capek, L., Hospodkova, A., and Solcova, O. (2010) Effect of silver doping on the TiO₂ for photocatalytic reduction of CO₂, *Appl. Catalysis B-Environ.*, **96**, 239-244, doi: 10.1016/j.apcatb.2010.02.030.
92. Cloutier, M., Mantovani, D., and Rosei, F. (2015) Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities, *Trends Biotechnol.*, **33**, 637-652, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.002.
93. Gao, Y., Truong, Y. B., Zhu, Y., and Kyratzis, I. L. (2014) Electrospun antibacterial nanofibers: production, activity, and *in vivo* applications, *J. Appl. Polym. Sci.*, **131**, 9041-9053, doi: 10.1002/app.40797.
94. Monteiro, N., Martins, M., Martins, A., Fonseca, N. A., Moreira, J. N., Reis, R. L., and Neves, N. M. (2015) Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin, *Acta Biomater.*, **18**, 196-205, doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.018.
95. Permyakova, E. S., Polčák, J., Slukin, P. V., Ignatov, S. G., Gloushankova, N. A., Zajíčková, L., Shtansky, D. V., and Manakhov, A. (2018) Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization, *Materials & Design*, **153**, 60-70, doi: 10.1016/j.matdes.2018.05.002.
96. Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., et al. (2020) Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review, *Front. Chem.*, **8**, doi: 10.3389/fchem.2020.00341.
97. Ponomarev, V. A., Sheveyko, A. N., Permyakova, E. S., Lee, J., Voevodin, A. A., et al. (2019) TiCaPCON-supported Pt- and Fe-based nanoparticles and related antibacterial activity, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 28699-28719, doi: 10.1021/acsami.9b09649.
98. Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., and Giannini, M. J. S. M. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, *J. Med. Microbiol.*, **62**, 10-24, doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.
99. Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Manakhov, A., Zhitnyak, I. Y., Gloushankova, N. A., et al. (2018) Synergistic and long-lasting antibacterial effect of antibiotic-loaded TiCaPCON-Ag films against pathogenic bacteria and fungi, *Mater. Sci. Eng. C*, **90**, 289-299, doi: 10.1016/j.msec.2018.04.068.
100. Saraeva, I. N., Tolordava, E. R., Nastulyavichus, A. A., Ivanova, A. K., Kudryashov, S. I., et al. (2020) A bacterial misericorde: laser-generated silicon nanorazors with embedded biotoxic nanoparticles combat the formation of durable biofilms, *Laser Phys. Lett.*, **17**, doi: 10.1088/1612-202x/ab5fca.

NEW-GENERATION ANTIBIOTICS, BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS AND NANOMATERIALS FOR COMBATING PATHOGENS

Review

I. G. Shemyakin¹, V. V. Firstova^{1*}, N. K. Fursova¹, I. V. Abaev¹,
S. Yu. Filippovich², S. G. Ignatov¹, and I. A. Dyatlov¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia; E-mail: firstova@obolensk.org

² Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

Received July 12, 2020

Revised September 14, 2020

Accepted September 14, 2020

This review presents various strategies to fight causative agents of infectious diseases. Species-specific programmable RNA-containing antibiotics open up new possibilities for creating next-generation of personalized drugs based on microbiome editing and can serve as a new tool for selective elimination of pathogenic bacterial species while keeping intact the rest of microbiota. Another promising approach in combating bacterial infections is genome editing using the CRISPR-Cas systems. Expanding knowledge on the molecular mechanisms of innate immunity has been actively used for developing new antimicrobials. However, obvious risks of using antibiotic adjuvants aimed at activation of the host immune system include development of the autoimmune response with subsequent organ damage. To avoid these risks, it is essential to elucidate action mechanisms of the specific ligands and signal molecules used as components of the hybrid antibiotics. Bacteriophage endolysins are also considered as effective antimicrobials against antibiotic-resistant bacteria, metabolically inactive persisters, and microbial biofilms. Despite significant advances in the design of implants with antibacterial properties, the problem of postoperative infections still remains. Different nanomodifications of the implant surface have been designed to reduce bacterial contamination. Here, we review bactericidal, fungicidal, and immunomodulating properties of compounds used for the implant surface nanomodifications, such as silver, boron nitride nanomaterials, nanofibers, and nanogalvanic materials.

Keywords: RNA-containing antibiotics, bacterial CRISPR-Cas systems, hybrid antibiotics, endolysins, nanosurfaces