



## Личинковата терапия, антимикробните пептиди и други алтернативи на антибиотичното лечение на хора и животни, с цел намаляване на АМР

**Нарастващото разпространение на мултирезистентни бактерии е световен проблем**, оставящ клиницистите с все по-малко възможности за лечение, което често води до използването на по-скъпо лечение, което **не винаги дава добри резултати**. За пример, в рамките на Обединеното кралство е имало 26% намаление на броя на наличните ефективни антибиотици за 20 години. Причината за това е тристранна. Първо, много често срещани патогени са развили резистентност към повечето класове антимикробни средства от първо поколение, което ги прави неподходящи за лечение. Второ, много големи **фармацевтични компании са променили фокуса на своите изследвания и разработки**, за да отговорят на нуждите на лечението на други заболявания, като диабет и затлъстяване. Трето, **разходите за разработване на един единствен антибиотик**, оценени на **300-550 милиона паунда**, могат да бъдат невъзможни, а свързаните с тях научни и регулаторни предизвикателства правят този вид разработки и инвестициите в тях по-рисковани от други изследвания, свързани с лекарствата.

Любопитен и притеснителен факт е, че **от 2009г. насам в САЩ са одобрени само два нови антибиотика** (пето поколение цефалоспорин, цефтаролин (*Teflaro*), през 2010г. и макроцикличния фидаксомицин (*Dificid*) през 2011г.) за лечение на *Clostridium difficile*, а през 2011г. се съобщава за девет интравенозни съединения, активни срещу резистентни Грам-отрицателни бактерии (*Dificid*). Очаква се **броят на новите антибиотици, пуснати на пазара в близко бъдеще, да продължи да намалява**, което ще затрудни все повече лечението на бактериалните инфекции, причинени от резистентни щамове бактерии, ще има все повече неуспех и ще бъде загубен интереса от страна на фармацевтичните компании да разработват нови антимикробни средства, тъй като **по-големи печалби се генерират от „Лайфстайл“ лекарствата**, които пациентите приемат за цял живот, в сравнение с кратка продължителност на лечението (обикновено 7-14 дни) на антибиотиците.

Антибиотичната резистентност се наблюдава при редица патогенни и непатогенни бактерии, като една от **най-често съобщаваните е метицилин-резистентен *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Мултилекарствената резистентност също се увеличава при Грам-отрицателните бактерии (напр. *Acinetobacter* spp. и *Klebsiella* spp. и **ESBL**). Лечението на други заразни заболявания като гонорея и туберкулоза става все по-трудно, като много щамове са резистентни към повечето класове АМС. Има **много малко възможности за лечение както в хуманния така и във ветеринарния сектор**. Този проблем не се ограничава само до болничната или здравната среда, като все повече резистентни изолати се наблюдават и при домашни и продуктивни животни. От 2006г. насам в рамките на ЕС е забранена употребата на антибиотични средства с цел увеличаване на растежа и благосъстоянието на продуктивните животни или с цел превенция. Затегнати са и практиките по безразборното предписване на АМС и отговорните лица в хуманната и ветеринарната

медицина, които имат право да предписват антибиотични средства, а антимикробните средства се изписват само с рецепта и не се продават свободно.

През 2001г. експертната комисия на ЕК, с цел да намали неправомерната употреба на антибиотици, е поставила шест приоритетни области на действие, насочени към минимизиране на по-нататъшното развитие на АМР, включително благоразумна употреба на антимикробни средства при хората (както в общността, така и в болниците) и животните, подобряване на контрола върху инфекциите и подобряване на образованието, разпространението на информация, научните изследвания и наблюдението, както и търсене и разработване на алтернативи на антибиотичните средства. Необходимо е:

- Подходяща терапевтична употреба на антимикробни лекарства в хуманната и ветеринарната медицина;
- Превенция както на здравните, така и на свързаните с общността инфекции, свързани с употребата на антимикробни средства; както и
- Стратегии за подобряване на разработването и създаването на нови антимикробни средства.

Научната общност все повече изразява опасенията си относно антимикробната резистентност в световен мащаб, а наскоро д-р Чан от СЗО е изказала мнение, че **сме изправени пред връщане към преантибиотична ера, освен ако не се направи нещо, за да се ограничи скоростта на развитие на антимикробна резистентност.**

Поради тези проблеми има подновен интерес към научните изследвания в областта на **алтернативните антимикробни средства** и по-целенасочени стратегии за лечение, включително терапии, използвани преди появата на антибиотиците, с **връщане към традиционните средства за защита и природните лекарства.** Тези нови лечения могат да допълнят антибиотичната терапия и да помогнат за намаляване на по-нататъшното разпространение и развитие на резистентност в бъдеще.

Някои примери за алтернативни лечения и терапии са изброени в **таблица 1**:

Алтернативна терапия	Възможен път на приложение
Пробиотици/ пребиотици/ бактериална намеса	Локално и системно приложение
Бактериоцини - лантибиотици	Локално и системно приложение
Етерични масла	Специфично лечение
Билки и растителни екстракти	Локално и системно приложение
Мед и пчелна отрова	Специфично
Личинки и ларви от насекоми	Специфично лечение
Метални йони	Специфично лечение
Пептидни антимикробни средства	Локално и системно приложение
Бактериофагова терапия	Локално и системно приложение
Ваксинална терапия	Системно приложение

**Таблица 1: Примери за алтернативни антимикробни терапии**

### Бактериоцини:

**Бактериоцините** са рибозомно синтезирани пептиди, получени от Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии. Те са класифицирани според механизмите си за убиване, механизми на резистентност и произвеждащия щам. Бактериоцините от

млечно кисели бактерии са известни като лантибиотици; те притежават пръстенови структури, образувани от аминокиселините лантионин или метиллантионин. **Лантибиотиците** се произвеждат от и действат предимно върху Грам-положителни бактерии: **низинът** (най-известният) се използва в млечната промишленост от началото на 80-те години на 20 век.

Бактериоцините са открити от *Gratia* през 1925г. Независимо от това, че на този етап употребата на **бактериоцините** е ограничена до **използването им като консерванти на хранителни продукти**, тяхното проучване като потенциални лекарства е многообещаващо. Именно продукцията на бактериоцини обуславя способността на някои пробиотични микроорганизми да инхибират патогенни или условно патогенни бактериални видове.

Бактериоцините са класифицирани в четири основни класа въз основа на тяхната структура и биологична активност: клас I (антибиотици) са малки (<5 kDa) термично устойчиви пептиди; клас II се състои от малки (<15 kDa), термично устойчиви, мембранно активни, немодифицирани пептиди; клас III се състои от термично лабилни протеини с размери над 15 kDa и клас IV се състои от бактериоцини със сложна химична структура, които имат липидни или въглеводородни остатъци.

**Повечето бактериоцини** взаимодействат с клетъчната мембрана и променят свойствата ѝ, което води до клетъчна смърт. Те са **по-активни срещу Грам-положителни бактерии** в сравнение с Грам-отрицателните, тъй като външната им LPS-съдържаща мембрана предотвратява свободната дифузия на молекули с молекулна маса над 0.6 kDa, а най-малкият известен бактериоцин е 3 kDa. Някои бактериоцини, обаче, притежават способността да бъдат транспортирани с участието на транспортни протеини, експресирани по повърхността на външната мембрана (*OmpF*, *FhuA*), както и на вътрешната мембрана (*SbmA*, *YejABEF*, *TonB*) на Грам-отрицателните бактерии.

„Интимните“ молекулни механизми на бактериоцините върху клетъчната мембрана са разнообразни. Някои от тях се свързват с молекулната „свалка“ липид-II, който е необходим за екстрацелуларния транспорт на пептидогликановите прекурсори през клетъчната мембрана, което в крайна сметка прекъсва синтеза на клетъчната стена и индуцира клетъчна смърт. Други бактериоцини образуват комплекс с липид-II, като формират пори в мембраните, което води до нарушаване на киселинно-алкалното и електролитното равновесие и промяна на мембранный потенциал. Бактериоцините, освен това, могат да повлияят навлизането на аминокиселини в клетките, да стимулират техния ефлукс, да предизвикат хидролиза или ефлукс на АТФ. Някои бактериоцини действат по механизъм, който не е насочен към клетъчната мембрана, като например такива с ендонуклеазна активност или със способност да лизират пептидогликана. **Потенциалните приложения на бактериоцините** като АМС са обобщени на **таблица 2**.

Идентифицирани са бактериоцини, които действат срещу много важни човешки патогени. Те са активни по отношение на тесен спектър от бактерии, но основното им предимство е, че като цяло не засягат голяма част от естествената микрофлора на организма, в сравнение с конвенционалните антибиотици.

Основен проблем, който възпрепятства успешното разработване на бактериоцините като лекарства, е бързото им разграждане под действието на протеолитични ензими. С оглед разрешаване на този проблем се разработват техни аналози с повишена протеолитична стабилност, както и лекарстводоставящи системи като полимерни наночастици и дендримери, които могат да предотвратят разграждането и да повишат бионаличността им в тъканите, засегнати от инфекция.

Бактериоцин	Продуциращ микроорганизъм	Инфекциозно заболяване/чувствителни патогени
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Кожни инфекции
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Кожни инфекции
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i>	Мастити
Lanthiopeptin	<i>Streptoverticillium cinnamomeum</i>	Herpes simplex virus
Mersacidin	<i>Bacillus subtilis</i>	Ванкомицин-резистентни щамове
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	Патогени с множествена лекарствена резистентност
S-35	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Белогробни инфекции

**Таблица 2: Преглед на по-важните бактериоцини, проучвани като потенциални антибиотици**

### Пептидни антибиотици:

Има два класа пептидни антибиотици: **нерибозомно** и **рибозомно синтезирани**. Нерибозомно синтезирани пептиди, напр. бацитрацин, грамицин и полимиксини се произвеждат предимно от бактерии и имат тесен спектър на активност. Много от тези антибиотици са били заменени през 70-те години, тъй като други нови класове антибиотици са произведени с по-широк спектър на активност. Напоследък употребата на тези антибиотици е подновена след химична модификация на неразтворимите стрептограмини и производството на два водоразтворими антибиотици, далфопристин и куинупристин (**Синерцид** - <http://www.medicine.bg/public/listovka/13275s.pdf>).

Рибозомно синтезираните катионни пептиди са известни като „**антибиотици на природата**“ и се произвеждат от всички видове организми (включително бактерии) като част от вродения защитен механизъм на гостоприемника: идентифицирани са при бозайници, земноводни, насекоми и растителни антимикуробни пептиди. Например жабешката кожа се е използвала в продължение на векове в Южна Америка като антимикуробно средство и съдържа 24-аминокиселинен пептид, който има хемолитични свойства. В пчелната отрова се съдържа такъв подобен пептид- мелитин, който е катионен антимикуробен пептид, но за съжаление вече не се използва поради токсичността си.

### Бактериална намеса:

Бактериалната намеса се отнася до **взаимодействията между пробиотиците/пребиотиците и бактериите**. Разбирането на взаимодействието на един вид с друг е област на интензивни изследвания. Разбирането на процесите на сигнализация, използвани в микробната комуникация и свързани с адхезията, производството на токсини и образуването на биофилми може да помогне за предотвратяване и дори лечение на инфекциозни заболявания в бъдеще. **Употребата на пробиотици** (предимно *Lactobacillus* spp.) с или без пребиотици за предотвратяване и лечение на инфекции, особено стомашно-чревни инфекции, е **много обещаваща**. Има редица съобщения, при които пробиотиците се използват профилактично със или без пребиотици (синбиотици) и са довели до намаляване на броя на инфекциите или

честотата на стомашно-чревни заболявания. Дали това се дължи единствено на производството на извънклетъчни продукти, които могат да потиснат растежа на патогена или се дължи на преференциална колонизация на полезните бактерии е област на много дебати.

Изследователите изучават и бактериалните взаимодействия на клетъчно ниво, като изследват интерактивните ефекти на генетичните регулаторни молекули сред различните видове. Известно е, че ролята на **ефекторните молекули** (олигопептиди в Грам-положителните бактерии и N-ацил хомосерин лактони в Грам-отрицателните) и натрупването им **контролира производството на факторите на вирулентност, както и образуването на биофилми**. Начинът, по който те акумулират, улеснява комуникацията между клетките и промяната на генната експресия, като в крайна сметка това може да доведе до производство на редица нови молекули. Тази област е особено обещаваща за бъдещото регулиране на факторите на вирулентност и за повишаване на разбирането ни за инфекциозния процес. Възможността за добавяне на определени известни молекули за предотвратяване на адхезия, колонизация, както и производството на фактори на вирулентност, които насърчават явна инфекция в области като лечение на рани, пост-хирургични интервенции и гастроинтестинални инфекции е обещаваща терапевтична възможност.

### **Ваксинална терапия:**

Създаването на **ваксини** е много **успешна стратегия за предотвратяване на силно заразни или сериозни инфекциозни заболявания**. Отличен пример за такава ваксина е тази за едрата шарка, което заболяване вече не е заплаха за човешкото здраве, поради прилагането на дългогодишна ваксинационна програма. Разработването на ваксини за всички инфекциозни агенти би било идеално, но понякога има трудности с имуногенността и защитния характер на ваксините. Разработването на ваксини за някои неживотозастрашаващи заболявания не винаги е рентабилно и антибиотичното лечение може да бъде предпочетено (напр. срещу *S. aureus*). Въпреки това, тъй като антимикробната резистентност е глобален нарастващ проблем, сега се разработват ваксини. **Срещу повечето инвазивни щамове на *S. aureus*** се разработва стафилококова **ваксина** в продължение на няколко години (напр. *StaphVAX*). *Nabi Biopharmaceuticals* обаче възнамеряват да добавят допълнителни детерминанти за вирулентност с цел подобряване на ефикасността. Има разработени комбинирани ваксини, които са насочени към микробни повърхностни компоненти, разпознаващи адхезивните матрични молекули (*MSCRAMMs*), като така пациентът може да бъде защитен от стафилококова инфекция чрез инхибиране на бактериите, свързващи се с гостоприемника.

### **Бактериофагова терапия:**

Литичната фагова терапия се използва **ефективно в Русия** в продължение на десетилетия и е **доказано ефективна срещу редица патогени**. Лечението се основава на прилагането на бактериофаг, специфичен за конкретен бактериален патоген (монотерапия) или посредством „коктейл от бактериофаги“ (политерапия). Това лечение е **нетоксично за гостоприемника, но смъртоносно за бактериите**. Бактериофагите могат да се прилагат перорално, интрамускулно или локално. Затова бактериофаговата терапия е **евтин, ефективен и специфичен начин за лечение на редица заболявания**. Бактериофагите са склонни да нарушават минимално нормалната чревна флора и са еднакво ефективни срещу чувствителни към

антибиотици и към резистентни бактерии, често лесно се откриват, способни са да нарушават бактериалните биофилми и могат да имат ниска токсичност. Съществуват редица различни препарати особено във ветеринарната област. Освен това поради относително ниската им цена в момента се предприемат много изследвания, за да се разшири прилагането им и в хуманната медицина.

### **Метали с антимикробни свойства:**

Някои метали се използват като антимикробни вещества, като **среброто, медта и титанът са най-често срещаните**. Всички те имат различни приложения, но се включват предимно в **нанокompозити, медицински изделия или повърхности**, за да се предотврати замърсяване или инфекция. Неотдавнашно проучване, при което е изследван антимикробния ефект на медните сплави при обзавеждането в клинична среда, показва по-ниски нива на микроорганизми на повърхностите на медните сплави в сравнение със стандартните материали и значително по-нисък брой резистентни на ванкомицин ентерококи, *S. aureus* и колиформи.

Повече литература е на разположение за антимикробния ефект на сребърните йони. Среброто се използва като антимикробно средство в медицината и околната среда от древността и е включено в редица материали и приложения (например катетри, превръзки, лабораторни и хирургически инструменти). Най-често срещаната **употреба на сребро в здравеопазването е лечението на силно колонизирани или инфектирани рани**, особено тези, колонизирани с мултирезистентни щамове като MRSA. Нанокристалното сребро изглежда има по-добра антимикробна активност и други сребърни соли (*in vitro*), поради по-малкия размер на частиците (20—120 nm) и нивото на сребро 70-100 ppm.

### **Лечебен клас пчелни продукти:**

**Медът** се използва като **антимикробно средство** в продължение на векове, и все още се използва широко за **лечение на рани**. Известно е, че високото съдържание на захар и наличието на водороден пероксид и прополис придават антимикробни свойства. В допълнение, осмотичният ефект на меда помага за отстраняване на излишния ексудат от раните и също така е много добър антимикробен агент (т.е. премахва некротичната тъкан). Медът от манука е монофлорен мед, произведен при опрашване на пчелите на новозеландското дърво *Leptospermum scoparium*. Включването на този мед в превръзки и лосиони се твърди, че притежава допълнителни ползи над обикновения мед, тъй като **съдържа следи от терпеноиди, които са естествени антимикробни вещества**.

### **Билки и растителни екстракти:**

Билкови и растителни средства са били използвани в продължение на векове и имат огромен потенциал за бъдещи антибактериални терапии. През пети век ПР.Н.Е. Хипократ пише „Лечебните Свойства На Над 350 Лечебни Растения“. По подобен начин гръцкият лекар Диоскорид написал информативната справочна книга за лечебните растения, Материя Медика, която се използва повече от 1600 години. Освен това египтяните използвали билки преди 5000BC за балсамиране на мъртвите, за да предотвратят разлагането.

Много изследователски групи са подновили интереса си към тези растителни лечебни средства и са фокусирали изследователските си програми върху изследване на

**антимикробните свойства на растенията** и техните екстракти срещу много устойчиви на лекарства бактериални щамове с надеждата за откриване на нови антибиотици.

Използването на газова хроматография и масспектрометрия (*Gc-MS*) показва, че растителните екстракти се състоят от сложна смес от **множество органични съединения**, много от които са с **антимикробни свойства**. Те включват **алкалоиди, кумарини, етерични масла (EOs), флавоноиди, флавоноли, флаволи, лектини, феноли и полифеноли, полиацетиленови съединения, полипептиди, хинини, танини и терпеноиди**. Изолирането и идентифицирането на вторичните метаболити на растенията и тяхното използване като активни съединения в лекарствените препарати наскоро привлече вниманието на фармацевтичната индустрия. Сега е известно, че тези съединения имат **редица биологични, химически и физически активности**, както и че растения като **карамфил, канела, чесън, мента и мащерка съдържат множество антимикробни съединения**, включително алкалоиди, катехини, фурани, полифеноли, танини, терпеноиди и терпени.

Традиционното използване на всяко растение обикновено се ръководи от неговата наличност и лекотата на приготвяне на екстракти. Съществуват различни методи за екстракция, използващи подходящи разтворители и техники за екстракция, а успехът на екстракцията се влияе от продължителността на периода на екстракция, използваният разтворител, рН и температура. Както пресни, така и сушени растителни материали могат да се използват като лечебни продукти, въпреки че повечето изследователи са склонни да използват сушен материал. Водата е отличен разтворител и традиционни лечители използват вода за извличане на съединения от сух растителен материал. Съединения като танини и терпеноиди са водоразтворими и са известни да имат антимикробна активност. Въпреки това, много от основните компоненти не са водоразтворими и за извличането им се използват разтворители като етери, нефтени етери, хлороформ, етилов ацетат и етанол.

**Етеричните масла (ЕО)** са сложна смес от летливи органични съединения, които допринасят за аромата на растението. Те могат да бъдат екстрахирани от всяка част на растението чрез парна дестилация, студено пресоване или използване на органични разтворители. Добивът може да варира между партидите от едни и същи растителни видове и между отделните части. Химичните компоненти могат да се различават при различните растения, които са ботанически идентични. Например, маслото от мащерка (*Thymus vulgaris*) обикновено съдържа 20-54 % **тимол** заедно с допълнителни съединения, като **карвакрол, р-цимен, линалол и мирцена**. Въпреки това различен хемотип от същите видове растения може да има **линалуол** като преобладаващ компонент.

ЕО са пример за вторични метаболити, които се състоят от въглеродородни съединения на базата на изопрен или 2-метил-1,3-бутадиен. Полимерите на това съединение се наричат терпени, монотерпени, сесквитерпени и дитерпени и т.н., и терпеноиди, които са терпенови производни, включващи абсцизна киселина, гиберелин и каротеноиди. ЕО може да съдържа окситерпеноиди, напр. киселини, алкохоли, алдехиди, естери, фурани, кетони, лактони, оксиди, пероксиди и феноли. **Тези съединения могат да повлияят на бактериалния растеж.**

Смята се, че **начинът на действие на ЕО е чрез разрушаване на клетъчната мембрана**, което причинява изтичане на калий. Доказано е също, че маслото от чаено дърво може да инхибира глюкозозависимите процеси при *Candida albicans*, *Escherichia coli* и *S. aureus*. При *C. albicans* инхибирането на йонните транспортни процеси и дишането води до **повишена пропускливост на мембраната**. **Маслото от чаено дърво** е широко прието в световен мащаб като **силен и ефективен антисептик** и се

използва в широк спектър от приложения в козметичната и медицинската промишленост, вариращи от шампоани за коса до превръзки за пациенти с изгаряния.

Няколко микробиологични проучвания показват, че има подобрен ефект, когато **ЕО се смесват и има доказани синергични ефекти с известни биоциди и антибиотици.** Проучвания от Обединеното кралство, показват, че добавянето на евкалиптовото масло към антисептичния хлорхексидин може да подобри проникването на хлорхексидин в кожата в сравнение с хлорхексидин самостоятелно. В допълнение, използването на евкалиптовото масло в комбинация с масло от чаено дърво и хлорхексидин може да неутрализира култури на *Staphylococcus epidermidis*.

Доказано е, че **когато се смесват ЕО с антимикробни средства, компонентите на ЕО да могат да отворят клетъчните мембранни канали, като по този начин позволяват по-лесното навлизане на антимикробните средства към целевите им места.**

Преглед на Cowan и екип през 1999г. относно използването на растения като антимикробни средства предоставя отличен преглед на отделните компоненти и техните активности. Оттогава броят на публикациите в тази област се разширява експоненциално и са приведени много примери за тяхното използване както локално, така и системно.

Въпреки че светът е изправен пред нарастващ брой случаи на инфекции с мултирезистентни микроорганизми и неефективност на конвенционалните терапии с АМС, учените не трябва да спират проучванията, свързани с алтернативни терапии и разработката на алтернативни природни лекарства. Много от тези алтернативи са традиционни лекарства, които са били изоставени след настъпването на антибиотичната ера. Без съмнение антибиотиците са доказали, че са безценни във войната с някои микроорганизми и са все още най-доброто лечение, което е налично за системни инфекции и перспективата да няма на разположение АМС за лечение в бъдеще е изключително тревожна. Затова **трябва да се продължи стратегията по развиване и създаване на алтернативи за лечение на по-малко животозастрашаващи инфекции и да спасим антибиотиците от критично важно значение и тези от крайна необходимост за лечение на по-сериозни инфекции.**

### Терапия с личинки и антимикробни пептиди:

С въвеждането на други лекарствени средства и по-специално антибиотици, терапията с личинки и голяма част от природните алтернативи отпадна. В последните години обаче, се намират в научната литература **все повече проучвания за употребата на червеите и личинките на някои видове мухи, както и протеините в тях в медицината поради ефикасността, безопасността и простотата на тази терапия.** Терапията с личинки се използва за отстраняване на некротични тъкани, като повечето протеини, произвеждани от личинките проявяват и антибактериални свойства.

В проучване на тема: „*Antimicrobial Peptides Expressed in Medicinal Maggots of the Blow Fly Lucilia sericata Show Combinatorial Activity against Bacteria*“ на авторски колектив: Anne-Kathrin Pöppel, Heiko Vogel, Jochen Wiesner, Andreas Vilcinskas, е доказано, че ларвите на обикновената зелена месарка (*Lucilia sericata*) **произвеждат антибактериални вещества, които имат терапевтичен ефект върху хроничните и нелечимите рани и бактериалните инфекции.** Последните развития в биотехнологията на насекомите позволяват използването на тези ларви като източник на нови антиинфекциозни вещества. В някои проучвания е приложено секвениране от



следващо поколение на РНК (*RNA seq*), за да се охарактеризират транскриптомите на ларвалните антимикробни пептиди (АМП) и протеини, секретирани в рани. Потвърждава се, че ларвите *L. sericata* са се адаптирали да колонизират микробиологично замърсени местообитания и **са защитени от инфекции посредством разнообразен спектър на АМП**. *L. sericata*-АМП включват не само **луцифензин** и **луцимицин**, но и нови протеини като **атацин, цекропин, дитерицин, богати на пролин пептиди и саркотоксини**. Идентифицирани са 47 гена, кодиращи АМП и синтетично са произведени 23 синтетични аналози, сред които някои показват антибактериална активност срещу широк спектър от микробни патогени, включително *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и *Enterococcus faecalis*. Срещу *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus*, са открити предимно адитивни ефекти и синергична активност, когато избраните АМП са тествани в комбинация.

Ларвите на обикновената зелена месарка *Lucilia sericata*, член на семейство *Calliphoridae*, са известни като **медицински личинки**, защото те са използвани в миналото за лечение на рани като част от традиционната медицина. Този подход, често наричан личинкова терапия, е **одобрена и просперираща алтернатива за лечение на хронични и нелекуващи се рани**, напр. тези, свързани с диабетни язви или пък **бактериални инфекции**. Терапевтичните ефекти включват отстраняване на некротичната тъкан, ускоряване на зарастването на раните и дезинфекция на раните. Свойствата на дезинфекцията на раната се дължат на антимикробните компоненти в секретите на ларвите, включително малки молекули с антибактериална активност и антимикробни пептиди (АМП), като например дедензин- подобните на луцифензин и наскоро съобщен АМП с мощна противогъбична активност, която съответно се нарича луцимицин.

Предпочитанията на *L. sericata* личинки да колонизират в мърша и некротични рани е допълнително изследвана и се доказва, че те са се адаптирали към живот в заразени среди, като механизмът им на защита се изразява в синтез на разнообразен спектър от АМП, за да ги предпази от микробите, които срещат. Тази теория е подкрепена от уникалната способност на личинките на мухата *Eristalis tenax* да оцеляват в силно замърсени водни местообитания, като например тор, помийни ями и фекални води, което също отразява тяхното производство на множество разнообразни АМП. По подобен начин бе открито, че бръмбарите от вид *Nicrophorus vespilloides*, който живее и възпроизвежда върху трупове, също произвежда широк спектър от АМП. **Синтезът на различни АМП също така осигурява потенциала за полезни комбинаторни взаимодействия**, като **адитивни антимикробни ефекти, синергия** (по-големи от адитивни ефекти) или **потенциране** (един АМП, позволяващ или засилване на активността на другите). Диверсификацията на гените, кодиращи АМП чрез дублиране и дивергенция на последователността, често се възпроизвежда на функционално ниво, като по този начин осигурява защита срещу по-широк спектър от микроорганизми.

Peptide	Sequence	pI	Molecular mass (g/mol)
<b>Putative cecropin-like</b>			
LSer-PCecL2	HHHHRFGKIGHELHKGVKKVEKVTVDVNVKVTSGVKKVASSIEKAKNV	10.2	5,260
LSer-PCecL3	HHHPGRIGHELHKGVKKVEKVTSDVNVKVTNGVQVANGIAKAKTVIEAGSIAGAVAAAAA	10.0	6,122
LSer-PCecL4	HHLPGKVGREIERSAHKVGHKLEHVRHEVSKTAKKVDKVVGHIKTAKKVVAAAGAIAGVVAAA	10.4	6,664
LSer-PCecL5	HHHLPGHVGHEVERSLHKVGHKLEHACHEVHKTKAKKVVQK	9.4	4,546
<b>Cecropins</b>			
LSer-Cec1	GWLKKIGKKIERVQHTRDATIQTIQVGAQQAANVAATLKG	11.4	4,319
LSer-Cec2	GWLKDFGKRIERVQHTRDATIQAIQVGAQQAANVAATVVRG	10.6	4,258
LSer-Cec3	GWLKKIGKKIERVQHTRDATIQVVGVAQQAANVAATARG	11.1	4,242
LSer-Cec4	GWLKKIGKKIERVQHTRDASIQAIQVGAQQAANVAATARG	11.1	4,127
LSer-Cec5	GLVKKIGKKIERVQHTRDASIQAIQVGAQQAANVAATARG	10.6	4,262
LSer-Cec6	GWLKDFGKRIERVQHTRDATIQAIQVGAQQAANVAATLKG	11.1	4,325
<b>Proline-rich</b>			
LSer-PRP1	EWRPHGSSNGSSLRPGRPQTLPPQRPIQPDFNGPRQRF	12.0	4,322
LSer-PRP2	EWRPHGISGSSLRPGRPQTLPPQRPRRPFNGPRHRF	12.2	4,371
LSer-PRP3	SPPVDRPRRPIQHNGPKPRIITNPPFNPNARPAW	12.2	3,945
LSer-PRP4	SWIKKDKFPSSTGPPYNNPPPPRF	10.0	2,758
<b>Stomoxyns</b>			
LSerStomox1	AGFRKRPNKLVKVKHTIKETANVSKDVAIVAGSGVAVGAAMG	10.7	4,455
LSerStomox2	GFRKRPNKLVKVKHTIKETANVSKDVAIVAGSGVAVGAAMG	10.7	4,384
<b>Defensins</b>			
LSer-Def1	ATCDLLSATGFSGTACAHAHCLLIGHRGGYCNTKSVCCRD	7.8	4,077
LSer-Def2	ATCDLLSGTGVKHSACAHAHCLLRNRRGGYCNRAICVCRN	9.0	4,123
LSer-Def3	ATCDLLSGTGANHSACAHAHCLLRNRRGGYCNKAVCVCNR	8.7	4,069
LSer-Def4	LTCNIDRSFCLAHCLLRGYKRGFPCTVKKICVCRH	9.4	3,959
LSer-Def6	GTCSPSSALCVVHCRVRYGYPDGYCSRKGICTCFRR	9.2	3,742
LSer-Def7	P'CNISYACKAHCILQGHKSGSCARINLCKCQR	9.2	3,545
<b>Antifungal</b>			
LSer-AFP	QHGYGAGGHQOQGYGSQHSNAPQGGHVVRBQGFSGHVHVBQQAGHNNHAGHNBQAGHNEQ SQQQVHGGQGHYKSHGY	6.6	8,200

**Таблица 3: Свойства и характеристики на 23-те синтетични антимикробни пептиди, идентифицирани в транскриптома на *L. Sericata***

Експресионните модели на отделните АМП са сложни и не винаги корелират със структурата или семейството на АМП. Например, експресията на АМП, принадлежащи към семейството на атацините, е силно променлива както по отношение на относителните нива на експресия, така и по отношение на тъканната специфичност. Най-силно експресирани АМП в слюнчените жлези и ларвената култура включват един от атацините (LSer-Atta2), цекропин (LSer-Cec8), повечето дефензини, няколко диптерицини и два саркотоксина, което предполага, че тези АМП могат да бъдат секретирани в отворени рани в по-големи количества. Противогъбичният пептид луцимицин се експресира при по-ниски нива в слюнчените жлези, отколкото в културата, но най-високите нива на експресия се наблюдават в останалата част от ларвалното тяло, по-специално във функционалния аналог на черния дроб на гръбначните животни.

Сред 47-те АМП, идентифицирани в транскриптома на *L. sericata*, в това проучване са подбрани **23, които могат да бъдат успешно синтезирани в контролирани условия пептиди**. При измерване на минималната инхибираща концентрация на тези пептиди срещу Грам-отрицателната бактерия *E. coli* са показани стойности на MIC, вариращи от 0,8 до 6,2 M за цекропините и стомоксините. Тези АМП също показват **умерена активност срещу Грам-положителната бактерия *M. luteus***, като MIC варира в диапазона от 27 до 112 M. Цекропините и цекропиноподобните пептиди показват умерена активност срещу *M. luteus* и **силна активност срещу *E. coli***. Установено е, че дефензините са активни срещу *M. luteus*, но не и срещу *E. coli* и само **стомоксин показва активност срещу *P. aeruginosa* DSM**

50071 (MIC, 31 M). Нито един от АМП не се показва активност срещу *S. aureus* в границите на тестваната концентрация.

Цекропините, стомоксините, цекропиноподобните и богати на пролин АМП на *L. Sericata* са тествани за антибиотична активност срещу панел от Грам-отрицателни патогени, в допълнение към Грам-положителните патогени (*Enterococcus faecalis* щам VRE 1528, щам *S. aureus* 511 и устойчив на метицилин *S. aureus* [MRSA] щам 134/39), както и щам *Mycobacterium smegmatis* 987, *Penicillium notatum* щам JP36 и *Candida albicans*. Нито един от тези АМП не е активен срещу Грам-положителните патогени *M. smegmatis*, *P. notatum* и *C. albicans*. Много умерена активност се наблюдава при два от богатите на пролин АМП срещу един щам на *E. coli* и един щам на *P. aeruginosa*. **Цекропините и стомоксините показват изразени анти-Грам-отрицателни бактериални активности**, като няколко от АМП инхибират всички тествани щамове, включително тези на *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa* и *Staphylococcus gallinarum*.

В това проучване е изследвана и **комбинаторната антибактериална активност на АМП**, като са тествани двойки АМП в различни съотношения, и отново са използвани контролни култури на *E. coli* и *M. luteus* като представители на Грам-отрицателни и Грам-положителни бактерии, съответно. **Адитивни ефекти** са наблюдавани, когато двойки АМП, представляващи стомоксините, цекропините или предполагаемите цекропиноподобни пептиди се комбинират, като стойностите на sumFIC са между 0,6 и 1,0. Умерена синергия срещу *M. luteus* се наблюдава, когато цекропинът Сесб се комбинира с дефензина Def4 и средната сума FIC варира от 0,41. Също така са комбинирани богатите на пролин пептиди, които са неактивни срещу *E. coli* и срещу *M. luteus*, с активен цекропин, стомоксин или цекропин-подобен пептид.

TABLE 2 MICs of *L. sericata* antimicrobial peptides for *E. coli* and *M. luteus*

Peptide	MIC (µM) (n) for <sup>a</sup> :	
	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>
LSer-AFP	>100	>100
LSer-Cec1	0.8 (2)	>100
LSer-Cec2	5.0 (6)	>100
LSer-Cec3	1.2 (2)	80.5 (5)
LSer-Cec4	1.1 (3)	112 (4)
LSer-Cec5	3.4 (3)	>100
LSer-Cec6	2.2 (9)	37.5 (7)
LSer-Def1	>100	>100
LSer-Def2	>100	>100
LSer-Def3	>100	16.4 (7)
LSer-Def4	>100	38.8 (14)
LSer-Def6	>100	51.6 (8)
LSer-Def7	>100	51.1 (6)
LSer-PRP1	>100	>100
LSer-PRP2	>100	>100
LSer-PRP3	>100	>100
LSer-PRP4	>100	>100
LSer-PCecL2	7.0 (2)	>100
LSer-PCecL3	7.6 (6)	>100
LSer-PCecL4	3.6 (10)	70.0 (5)
LSer-PCecL5	18 (8)	>100
LSerStomox1	6.2 (14)	27.5 (5)
LSerStomox2	6.2 (3)	37.5 (2)

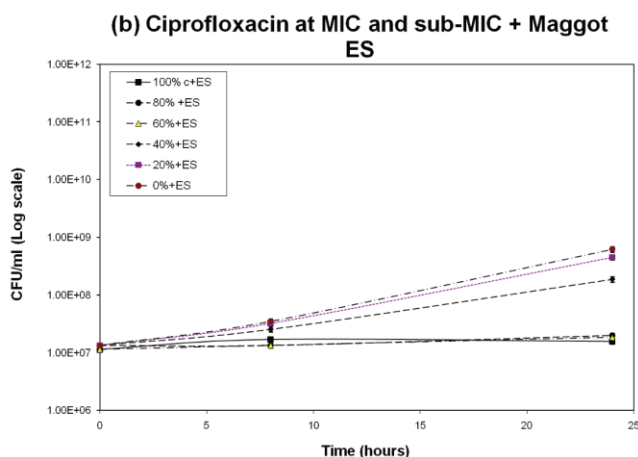
TABLE 3 Interactions of two *L. sericata* peptides against *E. coli* and *M. luteus*

Peptide combination	sumFIC (n) <sup>a</sup>	Interaction
<i>E. coli</i>		
PCecL5 + Stomox1	0.98 ± 0.25 (9)	Additive
Cec6 + PCecL4	0.82 ± 0.17 (11)	Additive
PCecL3 + Cec2	0.82 ± 0.22 (2)	Additive
PCecL5 + Cec6	0.85 ± 0.14 (2)	Additive
Cec2 + Stomox2	0.64 ± 0.04 (3)	Additive
Cec6 + Cec5	0.60 ± 0.17 (3)	Additive
PCecL4 + PCecL2	0.72 ± 0.10 (3)	Additive
<i>M. luteus</i>		
PCecL4 + Cec3	1.00 ± 0.00 (3)	Additive
PCecL4 + Def4	0.85 ± 0.17 (4)	Additive
Stomox1 + Def6	1.00 ± 0.00 (3)	Additive
Cec6 + Def4	0.41 ± 0.13 (15)	Synergistic
Cec4 + Def3	0.60 ± 0.00 (3)	Additive

В проучване на тема „*Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on Staphylococcus aureus*“ на авторски колектив: *Shuchi Arora, Carl Baptista, Chu Sing Lim* **терапията с личинки** и техните метаболити са изследвани за антибактериална активност. Тази терапия се е **доказала като достатъчно ефективна за лечение на рани и инфекции, причинени от резистентни на много антибиотици *Staphylococcus aureus***. В настоящото проучване е демонстрирана антибактериалната активност при екскреция/секреция (ES) на различни активни вещества от личинки на *Lucilia cuprina blowfly*. Екстрактите също са изследвани за тяхната антибактериална активност в комбинация с антибиотик, като ципрофлоксацин.

Оригиналните вещества ES показват частично инхибиране на бактериалния растеж. Въпреки това, в комбинация с ципрофлоксацин, при суб-инхибиторни

концентрации, някои комбинации показват висока анти-стафилококова активност, с намаляване на бактериалните колонии до 50%, след 24 часа. Шестдневното проучване върху *S. aureus*, изложени на комбинация ES-ципрофлоксацин, показва потенциално забавяне в развитието на адаптивна резистентност, за разлика от това, когато ципрофлоксацин се използва като единичен агент. Комбинираният ефект на ES и ципрофлоксацин при нива под MIC показва засилена антибактериална активност в сравнение с ефекта на ES и ципрофлоксацин като единични агенти. Въз основа на резултатите от комбинации ES-ципрофлоксацин може да се предложи като по-ефективно и безопасно средство за лечение на *S. aureus*.



фиг. 1: комбинаторен ефект на ципрофлоксацин и АМП

Резултатите ясно показват **потенциране на антибиотичната активност**. ES се анализира чрез GC-MS и разкрива присъствието на антибактериално съединение, **фенилацеталдехид** и има алкално рН. И двете открития подкрепят антибактериалната активност на ES.

В проучване на тема: „*A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy*“ на авторски колектив: *Anders S. Andersen, Dorthe Sandvang, Kirk M. Schnorr, Thomas Kruse, Søren Neve, Bo Joergensen, Tonny Karlsmark and Karen A. Krogfelt* още веднъж се потвърждава ролята на личинките и техните **антимикробни пептиди в борбата с патогенните бактерии**, резистентни към повечето класове антимикробни средства. В това проучване са изследвани следните микроорганизми: *Staphylococcus carnosus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. Ясно е показана **ролята на лудицензина**, който се произвежда рекомбинантно като Trx-слят протеин в *Escherichia coli*, пречистен с помощта на афинитетна хроматография и обратнофазова HPLC и е тестван *in vitro* срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактериални щамове. Резултатите сочат, че лудицензин е бил **активен срещу *Staphylococcus carnosus*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae* (MIC 2 mg/L), както и срещу *Staphylococcus aureus* (MIC 16 mg/L)**. Пептидът не показва антимикробна активност спрямо Грам-отрицателни бактерии. MIC на лудицензин за тестваните метицилин-резистентни *S. aureus* и междинни изолати на *S. aureus* варира от 8 до повече от 128 mg/L. Резултатите от TAST не разкриват силно секретирани съединения с предполагаема антимикробна активност, което предполага алтернативна антимикробна активност на MDT. **Лудицензин показва антимикробна активност, сравнима с други дефензини и може да има потенциал като бъдеща основа за кандидат лекарствени средства с**

**антибактериално действие**, за препроектиране за други приложения, освен за локално лечение на инфектирани рани.

Species	ATCC no.	Lucifensin MIC (mg/L)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12344	2
<i>Staphylococcus carnosus</i>	51365	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	29737	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	32
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	32
<i>Escherichia coli</i>	25922	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	>128

**Фиг.2: бактериални щамове, срещу които луцифензин е активен и MIC стойностите**

Личинките на *L. sericata* са били използвани за лечение на инфектирани рани от векове и се използват и в момента, когато други лечения се провалят, както пролича в проучванията, представени в изложението. Следователно е **важно да се идентифицират антибактериалните механизми в личинките и да се пречистят компонентите, които биха могли да се използват в съвременната медицина.** Предишни проучвания на антимикуробната активност, включени в MDT са извършени основно с помощта на хроматографски подходи, прилагани към ES на цели личинки, където са идентифицирани вещества с ниско молекулно тегло (<500 Da). Подобен подход е извършен с помощта на HPLC за изследване на цели личинкови екстракти от имунопредизвикани личинки и идентифицира три известни компоненти с ниско молекулно тегло: р-хидроксibenзоена киселина, р-хидроксифенилоцетна киселина, и октахидро-дипироло [1,2- $\alpha$ ; 1', 2'-d] пиазин-5,10-дион, известен също като цикличен димер на пролин или пролин дикетопиперазин или цикло [Pro, Pro] . Скорошен EST проект, фокусиран селективно върху антисептично индуцируеми гени в *L. Sericata*, използвайки данни на библиотеката на cDNA, идентифицира няколко предполагаеми пептиди и протеини, потенциално участващи в *L. Sericata* имунитет. Сред протеините, причинени от септично увреждане, които се отделят при имунния отговор са сапепин-В хомолог, хомолог на диптерицин, нови богати на пролин АМП, серин протеази, трансферин, феритин и лизозими от насекоми, но нито една от идентифицираните последователности с частична дължина не е транслирана в рекомбинантно експресирани антимикуробни съединения. Въпреки това, паралелно на това изследване, аминокиселинната последователност на луцифензин пептида е открита. Пептидът е открит в червата, слюнчените жлези, мазнините и хемолимфата на личинките и беше доказано, че има антимикуробна активност срещу *Micrococcus luteus*. Тези резултати по този начин потвърждават идентичността на последователността на луцифензин пептида, идентифицирани чрез технологията TAST (*transposon assisted signal sequence trapping*). TAST технологията е предназначена за селективно идентифициране на секретирани протеини, съдържащ сигнална пептид. Методът вече се използва отдавна за успешно идентифициране на мощни АМП и има явното предимство, че необходимото количество личинки е ограничено в сравнение с HPLC подхода за пречистване на съединенията или екстрактите от цели личинки. В сравнение с други EST подходи, TAST има ясно изразената полза, тъй като избира секретирани пептиди и протеини. Необходимо е да се изгради cDNA библиотека от цели личинкови екстракти и SC личинки, предизвикани при условия, имитиращи условията и предизвикателствата, пред които са изправени личинките по време MDT(*maggot*

*debridement therapy*). Списъкът с предполагаеми секретирани протеини, идентифицирани по време на това проучване включва редица последователности с пълна дължина, хомоложни към протеини, участващи в имунитета при насекоми и личинките им от семейство *Diptera* и други насекоми. **Лектините и протеините за разпознаване на пептидогликаните (PGRP) са важни медиатори в имунитета на насекомите.** Техните функции включват откриване и неутрализиране на патогените. Доказано е, че С-типът лектин CLEM-36 при *Sarcophaga peregrina* проявява антимикробна активност. В това проучване са идентифицирани нови PGRP с пълна дължина (ZY200234) и лектини (ZY200235), които също показват антибактериална активност. Голям АМП предшественик, принадлежащ към семейството на атацините с хомология със саркотоксин ПА е идентифициран също и е доказано, че **саркотоксин ПА инхибира синтеза на клетъчната стена** и образуването на клетъчна стена при *E. coli*, и е доказана активността на атацините срещу Грам-отрицателните бактерии. Доста големият размер на атациновите полипептиди затрудняват изследванията на активността и поради тази причина е налична ограничена информация.

Счита се, че луцифензин е специфичен спрямо Грам-положителни микроорганизми и най-вече срещу *S. carnosus*, *S. Pneumoniae* и *S. pyogenes*. Съобщава се, че **MDT е ефективен при изкореняването MRSA**, и тъй като MRSA са разрастващ се проблем в областта на ветеринарния и хуманния здравен сектор в световен мащаб и по-специално в лечението на хронични инфекции, пептидът е тестван срещу няколко MRSA и GISA изолати. Забележително е, че луцифензинът наистина показва антимикробен ефект срещу MRSA и GISA изолати, сравним с други дефензини.

Остава въпросът дали пептидът луцифензин има потенциала да се превърне в кандидат за фармацевтично лекарство или ползата от него ще остане ограничена само до директното прилагане на личинки при инфекциозни рани. Като цяло развитието на АМП в терапевтични средства е възпрепятствано от техния потенциал за токсични странични ефекти, неоптимална ефикасност, чувствителност към соли, чувствителност към серумни протеази и най-вече липсата на икономически ефективни и търговски производствени системи. Неотдавнашните опити за разработване на дефензини за медицински приложения обаче успешно се справиха с тези проблеми. В комбинация с **мощната активност на луцифензин срещу клинично значими видове *Streptococcus* при физиологични нива на сол, изглежда, че пептидът е обещаващ антиинфекциозен кандидат за по-нататъшно разработване на лекарство.**

За да се определи окончателно обаче дали луцифензин наистина е с висока антимикробна активност, бъдещите проучвания трябва да валидират експресията на луцифензин чрез Q-PCR в различни времеви точки от жизнения цикъл на личинките.

В заключение, в проучване на тема „*Pharmacological Properties of the Medical Maggot: A Novel Therapy Overview*“ на авторски колектив *Litao Yan, Jin Chu, Mingshu Li, Xianfeng Wang, Junwei Zong, Xueyang Zhang, Mingzhi Song u Shouyu Wang* много добре са систематизирани и представени повечето от биоактивностите и употребите на личинките и метаболитите от тях като АМП:

Bioactivity	Substance/component/molecule	Object	Mechanism
Antibacterial	Ammonium carbonate	-	Raise PH value
	Allantoin	-	-
	Lucifensin	<i>Staphylococcus Streptococcus</i> species	Form ion channels or transmembrane pores
	Lucifensin II	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	Lucilin	Multidrug resistance Gram-negative bacteria	-
	MAMP	Standard and antibiotic-resistant strains of <i>Staphylococcus aureus</i>	Increase membrane permeability
Antibiofilm	Seraticin	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i>	Lysis of the bacterial membrane
	p-Hydroxyphenylacetic acid p-Hydroxybenzoic acid Proline diketopiperazine	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Synergistic effect with antibiotic	Chymotrypsin I	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Disrupt protein adhesin-mediated biofilm formation Digest DNA in biofilm
	DNase	-	-
Antifungal	Serine proteases	Gentamicin, flucloxacillin Ciprofloxacin Vancomycin, daptomycin, clindamycin	Reduce minimal inhibitory concentration (MIC) Break down biofilm to allow the bacterial cells exposure to the antibiotics
	Lucimycin	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> , <i>Zygomycota</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Phytophthora parasitica</i>	Metal complex formation to a specific receptor
Anti-inflammation	ES	Neutrophils	Reduce superoxide generation, myeloperoxidase, and CD11b/CD18 Inhibit neutrophil chemotaxis Cyclic AMP-dependent mechanism
	ES	Monocytes	Inhibit monocytes chemotaxis Decrease in IL-12p40, TNF- $\alpha$ , MIF Increase in IL-10
	ES	Macrophage	Differentiate from proinflammatory to proangiogenic type Decrease MIP-1 $\beta$ , RANTES, and PDGF-BB Increase MCP-1 and IL-8
	Kind of thermostable protein	Complement system	Break down complement proteins C3 and C4
Immunomodulatory	BLP	T lymphocyte	Downregulate IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13, and CD25 Upregulate TNF- $\alpha$ and TGF- $\beta$
Proangiogenic	Unsaturated fatty acid	Microvascular endothelial cell	Improve migration Activate AKT1 signaling pathway
	Histidine Valinol 3-guanidinopropionic acid	Human umbilical vein endothelial cell	Improve migration Enhance VEGFR-2, CD34 and CD68
	Not identified	Hepatocyte growth factor	Downregulate c-Myc, VEGF and cyclin D1 Activate STAT3 and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway
Fibroblast migration/proliferation and ECM remodelling	Kind of serine proteinases	Fibroblasts keratinocytes	Increase cell metabolism and protein production (secondary lysosomes and residual bodies)
	Trypsin/chymotrypsin-like serine Metalloproteinases Aspartyl proteases	EMC components	Degrade fibronectin Solubilize fibrin clots Digest ECM components
Procoagulant	Jonah-like protein	Human plasma Whole blood	Reduce clotting time Activate contact proteins factors XII, IX, and kininogen
Neuranagenesis	Homogenate products	-	Promote neuropeptides (PGP 9.5 and substance P) release
Antitumor	$\omega$ -6 PUFA	Human leukemia cells A-549 lung cancer cells H22 hepatoma	Activate p38MAPK signal pathway
Antiatherosclerosis	ES	Murine serum	Decrease TC, TG, LDL Increase HDL Regulate CD4+/CD8+ ratio

**Таблица 4: Видове АМП и механизмът им на действие**

## Терапия с личинки във ветеринарната медицина:

Използването на личинки за почистване на мъртва тъкан от рани на животни е част от народната медицина в много части на света. Това е особено полезно при хроничен остеомиелит, хронични язви и други гнојни инфекции, които често се причиняват от впрягане на животните. Терапията с личинки при коне в САЩ е въведена отново след проучване, публикувано през 2003г. от ветеринарния лекар д-р

Скот Морисън. При конете е описана терапия с личинки като алтернативен подход към лечението на септичен навикуларен бурсит, копитни инфекции и некроза в случаи на усложнен ламинит (Morrison, 2005), остеомиелит и други заболявания на копитата (Jurga and Morrison, 2004). Тази терапия се използва и при супраспинозен бурсит, патология, рядко срещана при еднокопитни в развития свят (Doumbia, 2006). Установено е, че терапията с личинки намалява времето за заздравяване при постхирургични костни разкъсвания и при лечение на хронични персистиращи незарастващи язви на краката, язви, некроза на хрущялна тъкан, навикуларен сепсис, хроничен остеомиелит / септичен артрит, хроничен абсцес на меки тъкани и остеомиелит, хроничен ламинит и обратна ротация, при разкъсано сухожилие на дигиталния флексор (Honnas et al., 1992). Другите състояния при конете, които могат да бъдат лекувани успешно чрез терапия с личинки, включват хроничен дигитален интерфалангеален ставен сепсис, остра каудална костна ротация и незарастващи язви на краката според проучвания на Wrights et al., 1999 и Richardson et al., 1986.

Терапията с личинки успешно се прилага и при други видове животни: магарета, кучета, котки и зайци, за да се осигури правилно отстраняване и контрол на инфекцията, особено, ако инфекцията не реагира на конвенционалната медицинска и/или хирургична терапия (Sherman et al., 2007).

Kocisova et al (2006) използва терапия с личинки при овце с остро и хронично възпаление на кожата. Преди да се използва терапия с личинки, животните са неуспешно лекувани с разтвор на 10% меден сулфат и окситетрациклин. **Дебридацията е бърза и селективна, а лечението се понася добре от животните.** В това проучване е наблюдавано, че личинките на *L. sericata* са способни да почистват раните след еднократно нанасяне.

От тези наблюдения във ветеринарната медицина и различни доказателства в хуманната медицина (Nigam et al., 2006b) **може да се препоръча терапия с личинки за отстраняване на рани, дезинфекция, като силно лечебно и мощно антибактериално средство и като алтернатива за справяне с наболелия проблем антимикробна резистентност.** Терапията с личинки вече е добре установена в съвременната медицина и личинките се отглеждат в контролирана лабораторна среда в Северна Америка, Европа и Израел (Ryan, 1997). Очакванията са, че ще има постоянно нарастване на търсенето на тази терапия, особено когато нейната ефикасност и разходна ефективност станат все по-широко признати. Остава обаче разбираема предпазливост и са необходими **допълнителни клинични изпитвания и лабораторни анализи, които изискват многоцентрово сътрудничество, финансиране и време.**

Много хора могат да се съмняват в използването на личинките като лекарство, те обаче трябва да имат предвид, че **голяма група лекарства идват от „аптеката на природата“.** Например, хирудин, бивалентен директен тромбинов инхибитор, извлечен от пиявици, е одобрен за индуцирана от хепарин тромбоцитопения и остри коронарни синдроми. Освен това е установено, че противовъзпалителният протеин-2, протеин, секретирани от *Ancylostoma duodenale*, служи като ново лечебно средство за алергична астма и потенциално други възпалителни заболявания. По същия начин личинката е истинско „съкровище от суровини“ за клинично приложение. MDT се използва широко в болниците през 30-те и 40-те години. Приложението на MDT почти изчезва от началото на 40-те до 80-те години поради изобретението на пеницилина и другите класове модерни антимикробни средства и по-добрите хирургични техники. Въпреки това, със задълбочаването на проблема с антибиотичната резистентност и намаляващият арсенал от ефективни антибиотици, **MDT се възроди като мощна, универсална терапия за хронични, нелечими инфекциозни рани и бактериални**



**инфекции**, причинени от патогени като MRSA и е доказано ефективен при заздравяването на рани или при овладяване на инфекциите, които реагират слабо на други форми на конвенционално лечение. Още по-изненадващо е, че комбинациите от **MDT и антибиотици засилват антибактериалната активност**. В допълнение, личинката произвежда различни активни съставки, като луцифензин с антибактериална активност, луцимидин с противогъбична биоактивност и химотрипсин с протеолитична активност. Освен това, много други молекули с полезни активности все още трябва да бъдат допълнително идентифицирани и охарактеризирани. За тази цел **следващото поколение секвениране може да бъде от полза на изследователите да фокусират вниманието си върху геномната информация**. Например, *Franta et al.* прилага секвениране от следващо поколение за анализ на **транскриптома на личинки** и идентифицира **577 клъстера, представляващи 185 вида пептидази**. Въпреки че подробна информация за функциите на тези пептидази не е предоставена, тя все пак дава достатъчно данни за по-нататъшната идентификация на биоактивни протеини в личинките. Всички тези молекули могат да бъдат **потенциални кандидати за терапия** и следователно масовото производство и употребата като рутинна терапия във ветеринарната и хуманната медицина са основен приоритет.

Напоследък използването на преходни вирусно-базирани и трансгенни системи за експресия на хетероложни протеини в ларви на насекоми привлича голямо внимание. Например, *Fossgreen et al.* използва трансгенна система за производство на човешки амилоиден протеин-предшественик в *Drosophila melanogaster*. По-подобно на гореспоменатото проучване, *Linger et al.* са създали и характеризирали щамове на **трансгенни личинки, които експресират и секретират човешки тромбоцитен растежен фактор-BB (PDGF-BB)**. PDGF-BB е изследван като възможно лечение на незарастващи рани чрез стимулиране на клетъчната пролиферация и оцеляване, производство и секреция на растежни фактори и ЕСМ съставки. Това изследване демонстрира за първи път, че личинките са способни да произвеждат човешки растежен фактор от трансгенните експресионни системи. Това хвърля светлина върху комбинацията от MDT и генното инженерство към ново клинично приложение. Генетично модифицираните личинки ще бъдат проектирани да експресират и секретират различни хетероложни протеини, които са по-полезни за зарастването на рани в бъдеще. „Лечебните личинки“, които са в основата на MDT, демонстрират разнообразни свойства като: могат да се използват като антимикробни средства, антибиотични, противовъзпалителни и лечебни средства, за биосинтез на активни съставки (напр. луцифензин, сератицин, химотрипсин, ДНК-аза и ненаситени мастни киселини). Развитието на рекомбинантни и трансгенни биоактивни молекули от личинките са едновременно предизвикателства и **възможности за алтернативно лечение на бактериалните инфекции, причинени от резистентни на повечето класове бактериални патогени и с висока ефективност и резултат**. Може би един ден в бъдеще тези молекули може да надминат използването на конвенционалните лечения и терапии с антибиотици и други биоциди при лечение на хронични бактериални инфекции и инфекциозни персистиращи рани.

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- Antimicrobial Peptides from Rat-Tailed Maggots of the Drone Fly *Eristalis tenax* Show Potent Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria - Rolf Hirsch, Jochen Wiesner, Armin Bauer, Alexander Marker, Heiko Vogel, Peter Eugen Hammann and Andreas Vilcinskas
- Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo - ZHEN ZHANG, JIANGNING WANG, BO ZHANG, HUANRAN LIU, WEI SONG, JIAO HE, DECHENG LV, SHOUYU WANG and XIAO GUANG XU
- Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy - Václav Čeřovský, and Robert Bém
- A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) - Antonio Moretta, Rosanna Salvia, Carmen Scieuzo, Angela Di Somma, Heiko Vogel, Pietro Pucci, Alessandro Sgambato, Michael Wolff & Patrizia Falabella
- Maggot Therapy and its Implications in Veterinary Medicine: An Overview - Latief Mohammad Dar, Syed Aashiq Hussain, Swaid Abdullah, Adil Rashid, Shradha Parihar, Faroze Ahmad Rather
- <https://medpedia.famar.bg/%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B0%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%B0>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15003695/>
- Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus* - Shuchi Arora, Carl Baptista, Chu Sing Lim
- <https://www.nature.com/articles/180916b0> - An Antibiotic from Maggots - E. R. PAVILLARD & E. A. WRIGHT
- Antimicrobial Peptides Expressed in Medicinal Maggots of the Blow Fly *Lucilia sericata* Show Combinatorial Activity against Bacteria - Anne-Kathrin Pöppel, Heiko Vogel, Jochen Wiesner, Andreas Vilcinskasa
- VIRULENCE FACTORS AND BACTERIOCINS AMONG CLINICALLY IMPORTANT BACTERIA BELONGING TO THE GENUS *ENTEROCOCCUS* - D. Atanasova, T. Strateva and I. Mitov
- Alternative Antimicrobial Approaches to Fighting Multidrug-Resistant Infections - Valerie Edwards-Jones
- BEYOND ANTIMICROBIALS: NON-TRADITIONAL APPROACHES TO COMBATING MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA – book - Natalia V. Kirienko, Laurence Rahme, You-Hee Cho
- A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy - Anders S. Andersen, Dorthe Sandvang, Kirk M. Schnorr, Thomas Kruse, Søren Neve, Bo Joergensen, Tonny Karlsmark and Karen A. Kroghfelt
- Pharmacological Properties of the Medical Maggot: A Novel Therapy Overview - Litao Yan, Jin Chu, Mingshu Li, Xianfeng Wang, Junwei Zong, Xueyang Zhang, Mingzhi Song and Shouyu Wang
- Proline-Rich Antimicrobial Peptides in Medicinal Maggots of *Lucilia sericata* Interact With Bacterial DnaK But Do Not Inhibit Protein Synthesis - Małgorzata Cytryn'ska, Mohammad Rahnamaeian, Agnieszka Zdybicka-Barabas, Kristin Dobsloff, Thole Züchner, Gue'naël Sacheau, C. Axel Innis and Andreas Vilcinskias
- Assessment of the antimicrobial properties of maggots - Leon Margolin, Philip Gialanella

- <https://www.contagionlive.com/view/maggot-debridement-therapy-as-an-alternate-treatment-for-mrsa-skin-infections>
- <https://www.nature.com/news/2007/070430/full/070430-13.html>
- <https://globalnews.ca/news/3010379/heres-why-maggots-could-be-key-to-killing-antibiotic-resistant-superbugs/>
- Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy - Václav Čerovský, and Robert Bém
- <https://www.drugs.com/npp/maggots.html>
- The antimicrobial activity of maggots: in-vivo results - P Steenvoorde, GN Jukema
- Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria - Domen Jaklic, Ales Lapanje, Klemen Zupancic, Dragica Smrke and Nina Gunde-Cimerman
- <https://inspiro-bg.com/antibiotitsite-i-izkustvoto-na-voynata/> - Антибиотиците и изкуството на войната, Брой № 2 (45)/април 2018, Белодробен микробиом и обоснована антибиотична терапия - Георги Момеков