

**Н. И. Хералова³, И. А. Базиков¹, А. Н. Мальцев¹, О. И. Седых¹,
В. А. Батурич¹, Рамеш К. Гоял², Мадху Гупта², М. В. Рубайло¹, Д. Ю. Гуров⁴**

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» МЗ РФ¹;
Делийский государственный научно-исследовательский фармацевтический университет,
Нью Дели, Индия²;
ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница»³;
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

ЭФФЕКТ СИНЕРГИИ ЭНДОГЕННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ПЕПТИДОВ В СОСТАВЕ НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ АНТИБИОТИКО-РЕЗИСТЕНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

УДК 616-092.9: 615.015.35: 615.099.036.1

В экспериментах на крысах создана модель инфицированного ожога для изучения эффективности комбинации выделенных эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов в составе ниосомально-го геля. В опытной группе при нанесении ниосомального геля с антимикробными пептидами линейная скорость заживления ран составила $(0,0272 \pm 0,0094)$ мм²/сут., что значительно превышало показатели контрольной группы. Вычисление величины процентной скорости заживления ран коррелировало с результатами относительной убыли площади ран: ниосомальный гель с антимикробными пептидами ускорял регенерацию ран. Особенно эта тенденция отмечалась в промежутке с 9-го по 16-й день эксперимента при ожогах, инфицированных золотистым стафилококком. На основании проведенных исследований в эксперименте на крысах сделано заключение об эффективности ниосомального геля с эндогенными антимикробными и низкомолекулярными плацентарными пептидами при 2-кратном нанесении на ожоги, осложнённые антибиотико-резистентной микрофлорой.

Ключевые слова: эндогенные антимикробные и низкомолекулярные пептиды, антибиотикорезистентность, ниосомы, доклинические исследования.

**N. I. Heralova, I. A. Bazikov, A. N. Maltsev, O. I. Sedykh,
V. A. Baturin, Ramesh K. Goyal, Madhu Gupta, M. V. Rubailo, D. Yu. Gurov**

SYNERGY EFFECT OF ENDOGENIC ANTIMICROBIAL AND LOW-MOLECULAR PLACENTARY PEPTIDES IN THE COMPOSITION OF NIOSOMAL GEL IN TREATMENT OF BURNS INFECTED BY ANTIBIOTIC-RESISTANT MICROBE

In experiments on rats, a model of an infected burn was created to study the effectiveness of a combination of isolated endogenous antimicrobial and low molecular weight placental peptides in a niosomal gel. In the experimental group, when applying niosomal gel with antimicrobial peptides, the linear rate of wound healing was $(0,0272 \pm 0,0094)$ mm² / day, which significantly exceeded the indicators of the control group. The calculation of the percentage rate of wound healing correlated with the results of the relative loss of wound area: niosomal gel with antimicrobial peptides accelerated wound regeneration. This tendency was especially noted in the period from 9 to 16 days of the experiment with burns infected with *Staphylococcus aureus*. Based on the studies carried out in an experiment on rats, a conclusion was made about the effectiveness of niosomal gel with endogenous antimicrobial and low molecular weight placental peptides when applied twice to burns complicated by antibiotic-resistant microflora.

Key words: endogenous antimicrobial and low molecular weight peptides, antibiotic resistance, niosomes, preclinical studies.

Проблема антибиотикорезистентности по-прежнему является актуальной, в том числе при инфекционном осложнении ожогового процесса. Причиной является то, что лечение инфицированных ожогов проблематично из-за устойчивости микробных штаммов к традиционным антибиотикам, а также из-за иммуно-

дефицита и нарушений микроциркуляции. Нарушения микроциркуляции, в свою очередь, снижают эффективность системных антибактериальных препаратов. Тем не менее попытки усилить эффективность с помощью местных противомикробных средств не всегда результативны [3].

В науке и медицине большое внимание уделяется веществам, воздействующим на антибиотико-устойчивую микрофлору (дефензины). Чаще всего альфа-дефензины появляются в организме в ответ на внедрение чужеродных микроорганизмов.

Отсутствие формирования резистентности к микроорганизмам является их главным преимуществом [5]. Однако антимикробные пептиды в силу своих химических свойств быстро разрушаются протеазами.

Рекомбинантные же дефензины на фармацевтическом рынке имеют высокую стоимость и чаще используются в диагностических наборах. Эти недостатки ранее нами были успешно устранены с помощью разработки технологии выделения эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови и их инкапсулирования в наноконтейнеры, представляющие собой ниосомы кремнийорганической природы [2]. В последующем на этой основе был получен ниосомальный гель [1]. Это позволило увеличить биодоступность, снизить себестоимость и повысить эффективность воздействия на антибиотико-резистентные микроорганизмы [4].

Разработка и изучение эффективности новых антимикробных наружных средств, позволяющих провести полноценную эпителизацию, особенно после осложнения ожогов антибиотико-резистентными микроорганизмами, являются

важной задачей для клинической микробиологии и фармакологии.

Для повышения эффективности регенерации повреждённой ткани использована комбинация выделенных эндогенных антимикробных и низкомолекулярных пептидов плацентарного происхождения, содержащих факторы роста, способствующих полноценной эпителизации.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить эффективность ниосомального геля с эндогенными антимикробными и низкомолекулярными плацентарными пептидами для лечения ожогов, осложнённых антибиотико-резистентной микрофлорой в эксперименте.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на 30 белых крысах 5-месячного возраста массой 200–250 г. Содержали животных в соответствии правилам лабораторной практики, которые используют для экспериментальных целей [6].

Для приготовления ниосомального геля эндогенные антимикробные и низкомолекулярные плацентарные пептиды в равном объёме инкапсулированы в кремнийорганические ниосомы по ранее разработанной методике [2]. Электронная микроскопия ниосом позволила выявить мультисферические везикулы размером от 20 до 100 нм (см. рис.).

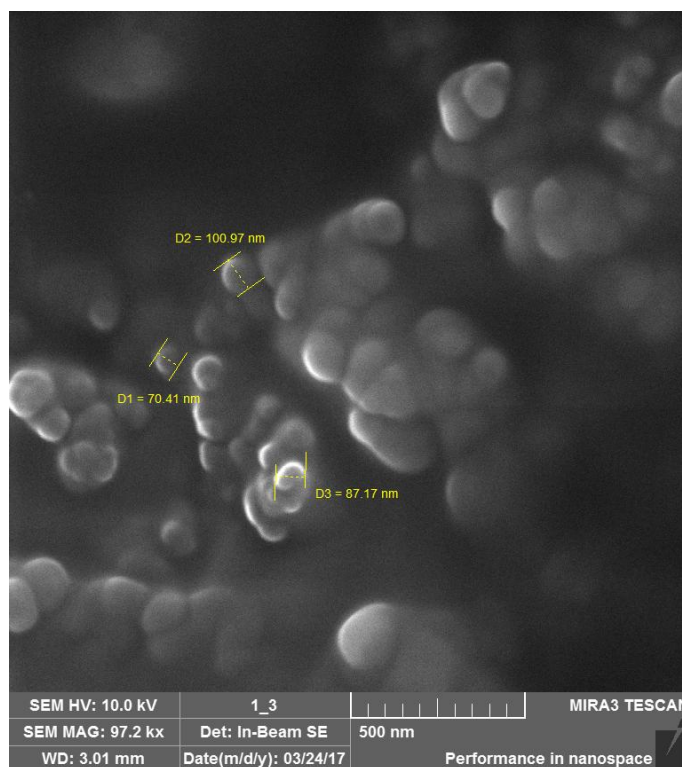


Рис. Результаты электронной микроскопии кремнийорганических ниосом

Инфицированный ожог моделировали на 30 крысах. Животные были разделены на 3 группы: контрольную и 2 опытных по 10 крыс в каждой.

Ожог получали при контакте с кожей паляльника, температурой 100 °С. Предварительно животные получали эфирный наркоз в течение 5 минут. Поверхность воздействия на коже составляла около 1 × 5 мм, в результате были повреждены все слои кожи.

Для изучения антимикробной активности разработанного ниосомального геля, животным наносили на рану культуру *Staphylococcus aureus*. Использовали микроорганизмы в стационарной фазе роста, предварительно разбавляя ее бульоном до 105–106 Мт/мл. На рану наносили 1 мл культуры.

В контрольной группе у крыс после ожога заживление происходило естественным путём. В первой опытной группе крысам, после нанесения ожога, на рану наносили мазь «Левомеколь» и во второй опытной группе – ниосомальный антимикробный гель с пептидами.

Лечение в опытных группах осуществляли следующим образом: гель в количестве 1–2 мл наносили на предварительно очищенную рану 2 раза в сутки. Применение геля осуществляли до эпителизации дефектов кожи.

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel и Statistica 6.0 с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ниосомальный антимикробный гель с пептидами при использовании 2 раза в сутки ускорял заживление инфицированных ран у крыс уже

в первые 5 дней лечения по сравнению с контролем и использованием препарата «Левомеколь».

При вычислении линейной скорости заживления ран (v) с 4-го по 9-й день эксперимента (первые пять дней лечения) в 1-й группе были получены следующие результаты: среднее значение v составило $(0,0053 \pm 0,0154)$ мм²/сут. Расчет v с 9-го по 16-й день эксперимента показал схожие данные – $(0,0049 \pm 0,0087)$ мм²/сут. – статистически достоверные отличия v внутри группы отсутствовали ($p = 0,9516$).

Линейная скорость заживления ран во опытной группе при применении препарата «Левомеколь» с 4-го по 9-й день эксперимента составила $(0,0099 \pm 0,0150)$ мм²/сут.; с 9-го по 16-й день эксперимента v достоверно не изменилась ($p = 0,1115$) – $(0,0253 \pm 0,0175)$ мм²/сут. (табл. 1).

В опытной группе при нанесении ниосомального геля с антимикробными пептидами величина v в первые 5 дней лечения составила $(0,0272 \pm 0,0094)$ мм²/сут. С 9-го по 16-й день эксперимента линейная скорость заживления ран достоверно не изменилась – $(0,0285 \pm 0,0127)$ мм²/сут. ($p = 0,8127$).

Величина относительной убыли площади ран коррелировала с линейной скоростью заживления ран. Показано, что наиболее эффективным из всех изученных препаратов оказался ниосомальный антимикробный гель (табл. 2).

Величина процентной скорости заживления ран также соответствовала результатам других вычислений (линейной скорости заживления ран и относительной убыли площади ран): ниосомальный гель с антимикробными пептидами ускорял регенерацию ран (в промежутке с 9-го по 16-й день эксперимента) инфицированных золотистым стафилококком.

Таблица 1

Линейная скорость заживления ран (мм²/сут) с 4-го по 9-й (v_9) и с 9-го по 16-й день (v_{16}) эксперимента

Крыса	Контрольная группа (заживление без лечения)		Опытная группа (лечение мазью «Левомеколь»)		Опытная группа (лечение ниосомальным антимикробным гелем)	
	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}
1	-0,0085	0,0209	-0,0129	0,0350	0,0316	0,0220
2	0,0245	0	0,0145	0,0127	0,0232	0,0052
3	0,0267	-0,0077	0	0,0229	0,0273	0,0381
4	-0,0073	0,0053	0,0222	0,0065	0,0194	0,0139
5	0,0075	0,0133	0,0231	0,0079	0,0267	0,0317
6	-0,0073	0,0049	0,0356	0,0357	0,0462	0,0357
7	0	0,0124	0,0082	0,0065	0,0390	0,0204
8	0,0255	0	0	0,0571	0,0240	0,0451
9	0,0060	0,0045	-0,0063	0,0444	0,0190	0,0317
10	-0,0138	-0,0044	0,0148	0,0245	0,0160	0,0408

**Относительная убыль площади ран (%) с 4-го по 9-й (ΔS_9)
и с 9-го по 16-й день (ΔS_{16}) эксперимента**

Крыса	Контрольная группа (заживление без лечения)		Опытная группа (лечение мазью «Левомеколь»)		Опытная группа (лечение ниосомальным антимикробным гелем)	
	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}
1	-5,0	8,6	-6,7	10,7	15,0	14,3
2	10,0	0,0	6,7	7,1	8,9	2,9
3	12,0	-7,1	0,0	9,5	12,0	14,3
4	-4,0	2,4	8,6	3,6	8,6	7,1
5	4,0	7,1	12,0	7,1	12,0	14,3
6	-4,0	2,4	13,3	14,3	15,0	14,3
7	0,0	5,7	4,0	3,6	16,0	14,3
8	10,0	0,0	0,0	14,3	10,0	14,3
9	2,5	2,0	-2,9	12,5	10,0	14,3
10	-8,0	-2,0	6,7	10,7	8,0	14,3

Наблюдение показало, что площадь раны у контрольной группы животных в первые 5 суток увеличивалась в размере. В опытной группе раны, обработанные ниосомальным антимикробным гелем с пептидами, увеличивались в размерах не столь значительно. Дальнейшее уменьшение ран в размерах шло более интенсивно по сравнению с контролем.

Разница в заживлении ран контрольной и опытной группы при лечении ниосомальным антимикробным гелем была очевидной с первых дней эксперимента до конца срока наблюдения. Ниосомы, содержащиеся в геле, обеспечивали пролонгированное действие эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов.

Таким образом, ниосомальный антимикробный гель с пептидами при использовании 2 раза в сутки стимулирует процессы регенерации и ускоряет заживление инфицированных золотистым стафилококком ран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использование ниосомального геля ускоряло и стимулировало регенерацию поврежденной ткани намного эффективнее в сравнении с мазью «Левомеколь».
2. Ниосомы кремнийорганической природы способствовали эффекту синергии двух типов пептидов за счёт их равномерного и пролонгированного высвобождения.
3. Непрерывное поступление в повреждённые ткани пептидов восстанавливает раневые

дефекты и практически полностью снижает воспалительные реакции, обусловленные антибиотико-резистентной микрофлорой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент на изобретение № 2655522 от 28.05.2018. Российская Федерация. Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв / Болатчиев А. Д., Батуринов В. А., Базиков И. А. – Текст : непосредственный.
2. Патент на изобретение № 2729016 от 04.08.2020. Российская Федерация. Способ выделения природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови. / И. А. Базиков, А. Н. Мальцев, В. А. Батуринов [и др.]. – Текст : непосредственный.
3. Ashtikar M., Wacke M. G. Nanopharmaceuticals for wound healing – Lost in translation. *Adv Drug Deliv Rev.* – 2018. – Vol. 129. – P. 194 – 218.
4. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo* / A. D. Bolatchiev, V. A. Baturin, I. A. Bazikov [et al.] // *Fundamental and Clinical Pharmacology.* – 2019.
5. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes / J. Dumville, B. Lipsky, C. Hoey, M. Cruciani // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* – 2017.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» // СПС «Консультант Плюс». – Текст электронный. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_20334.