

*На правах рукописи*

**Хералова Наталья Ивановна**

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НИСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ ПРИ  
ИНФИЦИРОВАННОМ ОЖОГЕ РОГОВИЦЫ**

1.5.11. – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Ставрополь – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Базиков Игорь Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Кафтырева Лидия Алексеевна** - доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория кишечных инфекций, заведующая

**Ипполитов Евгений Валерьевич** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Согласно опубликованному 8 октября 2019 г. Всемирной организацией здравоохранения первому Всемирному докладу о проблемах зрения, более 1 миллиарда человек во всем мире живут с нарушениями зрения. По данным различных исследований, ожоги глаз составляют до 38% в общей структуре глазного травматизма (Гундорова Р.А. и соавт., 2014). Значительную часть ожоговых травм глаз составляют поражения химическими веществами, на долю которых приходится от 63,0 до 86,7 %, среди них в 3/4 случаев встречаются щелочные (Мороз О.В., 2014; Baim A.D. et al., 2019). В результате ожога при нарушении целостности оболочек глаза происходит контаминация внутренних структур условно-патогенными бактериями. Высокая вариабельность микробных возбудителей конъюнктивы, повышение роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры и появление антибиотикорезистентной микрофлоры приводит к инфицированию ожогов.

Снижение защитных механизмов гуморального и местного иммунитета также приводит к развитию инфекционных осложнений ожогов глаз, и как следствие этого - затруднению социальной адаптации пациентов работоспособного возраста, резкому снижению качества жизни пациентов (Манукян М.Е., 1983). Важным звеном гуморального иммунитета являются цитокины. Исследование ключевой роли цитокинов в противостоянии инфицированному ожогу позволит взглянуть по-новому на протекающие на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях процессы.

Традиционные методы лечения пациентов с ожогами роговицы различной этиологии не всегда эффективны, в связи с чем поиск и разработка новых методов лечения инфицированных ожогов остаются все так же актуальными. Эндогенные антимикробные пептиды (дефензины) не вызывают резистентности бактерий или образования биопленки из-за их ионной структуры. В этой связи, внимание исследователей привлечено к поиску возможностей разработки и изучения новых антимикробных средств с применением эндогенных антимикробных пептидов (Мальцев А.Н., 2021).

Один из перспективных методов лечения ожогов роговицы - использование плацентарных пептидов. Ранозаживляющая роль пептидов заключается в их мощном регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза, помимо этого известна высокая антимикробная активность экстракта клеток плаценты (Мальцев А.Н. и др., 2018).

В тоже время активно развивается новое направление в совершенствовании местного лечения - разработка носителей лекарственных средств, применение которых позволяет обеспечить оптимальный процесс эпителизации раневой поверхности и повышение эффективности ранозаживления. Так, в практике была отмечена высокая эффективность восстановительного лечения слизистой оболочки полости рта стоматологическим нисосомальным гелем, клиническая эффективность которого значительно превышает эффективность стандартных методов лечения (Базиков И.А. и др., 2018; Базиков И.А., и др. 2019). Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, являются важной задачей для клинической микробиологии и офтальмологии.

### **Степень разработанности темы исследования**

К настоящему времени, достижения медицины в области лечения инфицированных повреждений слизистой оболочки глаз связаны с использованием новых антимикробных и биологических модуляторов. К ним относятся низкомолекулярные пептиды с факторами роста и цитокинами (включая ингибиторы передачи сигналов и микро-РНК), генная терапия, стволовые клетки. Рядом учёных для стимуляции регенеративных процессов в роговице разработан гомологичный фибронектин и другие клеточные продукты (Лошкарева А.О., 2016; Funderburgh J.L. et al., 2016; Ghoubay-Benallaoua D. et al., 2017). Авторами выявлено положительное влияние инстилляций фибронектина на раневой процесс в роговице при ожоговой болезни глаз. Перспективными разработками являются исследования по использованию наноконтейнеров для адресной доставки (Cavalieri F. et al., 2014; Dhamodaran K. et al., 2015; Diskaeva E. et al., 2021). Данные

о высокой клинической эффективности применения ниосом кремнийорганической природы как наноконтейнеров (Базиков И.А. др., 2022) позволяют их позиционировать для доставки антимикробных комбинированных пептидов различной природы.

Необходимость разработки новых антимикробных средств для борьбы с бактериальными осложнениями химических ожогов послужила основанием для проведения данной работы.

**Цель исследования** - разработка методики получения и изучение влияния антимикробных эндогенных пептидов в составе ниосомального геля на микроорганизмы при лечении инфицированного ожога роговицы

**Задачи исследования:**

1. Исследовать состав микробиоты у пациентов с инфекционными осложнениями химических ожогов роговицы.
2. Разработать антимикробный ниосомальный гель на основе технологии выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов и инкапсулирования их в кремнийорганические ниосомы.
3. Изучить антимикробную активность ниосомальных гелей с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы в диско-диффузионном методе и методе микроразведений.
4. Изучить безопасность антимикробного ниосомального геля с пептидами на экспериментальных животных.
5. Изучить уровень цитокинов и патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем с пептидами.
6. Оценить антимикробную и регенераторную активность ниосомального геля с пептидами при заживлении инфицированных ожогов в эксперименте.

**Научная новизна**

На основании микробиологических и микроскопических методов исследования проанализирован видовой состав нормобиоценоза слезной жидкости и роговицы человека, выделено и идентифицировано 103 культуры микроорганизмов, при изучении которых выявлено преобладание в структуре возбудителей коагулазонегативных стафилококков (*Staphylococcus epidermidis* - 53%), что свидетельствует о том, что условно-патогенная микрофлора может выступать в качестве этиологического агента в инфицировании химических ожогов роговицы.

В результате исследования впервые подобрана комбинация эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов из тромбоцитарно-лейкоцитарной массы, на основе которых разработан новый антимикробный гель и отработана технология инкапсулирования пептидов в кремнийорганические ниосомы для повышения биодоступности и биосовместимости полученного геля.

Изучена антимикробная активность выделенных эндогенных дефензинов к микроорганизмам у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы в диско-диффузионном методе и методе микроразведений и доказана его антимикробная активность, превышающая в 2,8 раз традиционно применяемую 1% тетрациклиновую глазную мазь.

Иммунологические показатели и патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы продемонстрировали синергию антимикробного и регенераторного действия ниосомального геля, проявленную в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны.

В ходе эксперимента исследован уровень цитокинов в слезной жидкости у экспериментальных животных с химическими ожогами роговицы и показана их роль в регуляции механизмов ранозаживления, заключающаяся в стимулировании выработки провоспалительных цитокинов ИЛ-1, являющихся регулятором воспаления в организме при повреждении тканей глаза.

Доклинические исследования безопасности разработанного антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами в диапазоне переносимых, токсических и

летальных доз не приводило к гибели экспериментальных животных и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций, что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Дополнены современные представления об этиопатогенетической роли условно-патогенной микрофлоры кожи в развитии бактериальных осложнений при химических ожогах роговицы.

Обоснованы новые методологические подходы на основе применения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов, инкапсулированных в кремнийорганические ниосомы, в разработке антимикробных и ранозаживляющих наружных средств для полноценного восстановления зрительных функций.

Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства при экспериментальных химических ожогах способствовало более раннему началу эпителизации и сокращению сроков лечения - в 2,2 раза.

При использовании геля выявлено снижение количества осложнений в 2,8 раза, рано- заживление происходило с уменьшением васкуляризации роговицы с 81,2 % до 55,3 % случаев, в сравнении с традиционными методами лечения, что, несомненно, будет оказывать влияние на работоспособность и уровень качества дальнейшей жизни пациентов, перенесших химические ожоги роговицы.

Доказанная антимикробная и регенераторная активность антимикробного ниосомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях.

Разработанный антимикробный гель продемонстрировал более высокую антимикробную активность, чем традиционно применяемая 1% тетрациклиновая мазь.

Полученные при выполнении диссертации данные используются в учебном процессе на кафедрах микробиологии, а также биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 31.05.2022 г.; акт внедрения от 31.05.2022 г). Разработаны технические условия (ТУ № 9158-007-76858530-2019 от 11 ноября 2019 г.) для производства антимикробного препарата на базе малого инновационного предприятия Ставропольского государственного медицинского университета «Регенерация».

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой настоящего исследования явился системный подход, в соответствии с поставленной целью и задачами.

Комплексный анализ и системный подход применялся для выполнения экспериментов и изложения результатов. Для достижения поставленных задач были внедрены современные технологии. Доказательность выполненного исследования основывалось на проведении экспериментального апробирования и микробиологического сравнения, контролируемого рандомизированного исследования, а также дедуктивного обобщения. Исследование включало выбор биологически активных действующих веществ, микробиологические и биотехнологические технологии, доклинические испытания токсичности на животных, инструментальные методы для определения иммунологических параметров и гистологические методы изучения эффективности разработанных антимикробных средств.

Предметом исследования явилось изучение микробиологического пейзажа и антимикробной активности выделенных эндогенных дефензинов к микроорганизмам у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы в диско-диффузионном методе и методе микроразведений, разработка антимикробного ниосомального геля, изучение его безопасности и эффективности на животных в соответствии с разрешением локального этического комитета СтГМУ (протокол № 60 от 15.12.2016 г.)

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для

экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg). В работе использованы микробиологические, иммунологические, биотехнологические, клинические, экспериментальные, гистологические, а также статистические методы исследования.

### **Материалы исследования**

#### **Пациенты**

Под наблюдением в офтальмологическом отделении Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ставропольского края «Ставропольской краевой клинической больницы» г. Ставрополя находились 100 пациентов с химическими ожогами различной локализации и этиологии, в том числе мужчин – 52 (52%), женщин – 48 (48%). Возраст пациентов варьировал от 18 до 79 лет (средний  $44,3 \pm 1,9$  лет). Выборка больных была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения. Критерии включения: пациенты в возрасте от 19 до 70 лет. Критерии исключения: наличие других тяжелых хронических заболеваний; отягощающего аллергологического анамнеза; хронических заболеваний ЖКТ, печени, почек, крови; хирургические вмешательства на ЖКТ (за исключением аппендэктомии); острых инфекционных заболеваний; прием лекарственных препаратов. В качестве клинических образцов для бактериологического исследования микрофлоры использовали слезную жидкость из конъюнктивальной полости пациентов.

#### **Животные**

Исследование было выполнено на базе вивария Ставропольского государственного медицинского университета. Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов породы «Шиншилла», весом 2,1–2,3 кг.

#### **Материалы для микробиологических методов исследования**

Проводили исследование микрофлоры конъюнктивальной полости пациентов. Бактериологическое исследование слезной жидкости проводили сразу же после её сбора, в течение 3 часов. Использовали стандарт мутности МакФарланда (производство BioSan, Россия) и диски с цефтаролином, Цефтаролин 5 мкг/диск (Bioanalyse, Турция). Посев слезной жидкости из конъюнктивальной полости осуществляли на следующие питательные среды: Агар Мюллера-Хинтон (Agar Muller-Hinton, Becton Dickinson Difco, кат. № 225250, далее – МХА-Difco), ГРМ-агар Оболенск «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой» (Россия, Оболенск, «Лабораторные препараты»); стафилококки выделяли на 2% желточно-солевом и 5% кровяном агарах; стрептококки на 5% кровяном агаре; дрожжеподобные грибы и грибы рода *Candida* на среде Сабуро; энтеробактерии на средах Эндо, Левина и Плоскирева (все среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили при оценке морфологических, культуральных и биохимических свойств. Использовали наборы стафи-, стрепто- и энтеротестов («ERBA LACHEMA», Чехия). Проводили анализ чувствительности нормальной и выделенной у пациентов микрофлоры конъюнктивальной полости к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами и цефтаролину (Sigma Aldrich, Германия). Для сравнительной оценки антимикробного действия выделенных дефензинов и цефтаролина использовали грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы: 1) контрольный штамм *E. coli* ATCC 25922 (Американская коллекция типовых культур); 2) контрольный штамм *S. aureus* ATCC 29213 (Американская коллекция типовых культур). Кроме контрольных штаммов для экспериментов по определению чувствительности к антимикробным агентам и МПК антимикробных агентов были выделены в бактериологической лаборатории штаммы *S. aureus* и *E. coli* (по 4 штамма) от здоровых людей и от больных с бактериальными осложнениями после химических ожогов роговицы: *S. aureus* 1з – от здоровых людей; *S. aureus* 2з – от здоровых людей; *S. aureus* 1б – от больных людей; *S. aureus* 2б – от больных людей; *E. coli* 1з – от здоровых людей; *E. coli* 2з – от здоровых людей; *E. coli* 1б – от больных людей; *E. coli* 2б – от больных людей.

## **Микробиологические методы исследования**

### **Диско-диффузионный метод для определения чувствительности тестируемых штаммов бактерий к дефензинам и антибиотикам**

Для проведения диско-диффузионного метода диски пропитывали выделенными дефензинами. После культивирования проводили учёт результатов, измеряя зоны полного подавления роста вокруг дисков с антибиотиком и дефензинами с точностью до миллиметра при помощи линейки, по внутреннему диаметру роста единичных колоний. Учёт результатов проводили в соответствии с методологией EUCAST. Для тест-штаммов микроорганизмов в целях контроля качества питательной среды (агара Мюллера-Хинтон) полученные значения диаметров зон подавления роста сравнивали с допустимым интервалом и целевым значением, находящимся в центре допустимого интервала, используя интерпретационные таблицы «Целевые и допустимые диапазоны значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) и диаметров зон подавления роста контрольных штаммов, рекомендуемых для повседневного контроля качества».

### **Метод микроразведений в бульоне (ММР)**

Проводили подготовку планшетов для микроразведений в бульоне. Рабочие растворы (по 50 мкл) помещали в лунки 96-луночного планшета с удвоенной желательной окончательной концентрацией антимикробного агента. Последние лунки в ряду, в которые помещали бульон без антибактериального агента, использовали для контроля бактериального роста. Аналогично, лунка, содержащая 100 мкл бульона (без антибактериального агента и без инокулюма), использовалась как неинокулированная лунка отрицательного контроля для каждого проверяемого штамма.

Предварительно осуществляли стандартизацию инокулюма – проверку чистоты культуры и подсчёт жизнеспособных колоний для каждого изолята. Для приготовления инокулюма использовали суточные культуры *E. coli* и *S. aureus*, выращенные при 37°C на агаре (ГРМ).

Приготовленные планшеты запечатывали в пакеты из полиэтилена (предотвращение высушивания) и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Результаты учитывали визуально при достаточном росте микроорганизма (явное пятно на дне лунки и помутнение бульона) в последних лунках в ряду (положительный контроль). Характер роста в тестируемых лунках сравнивали с характером роста в положительном контроле. Наиболее низкую концентрацию АМП, полностью подавляющую видимый рост бактерий, регистрировали как МПК. В качестве контроля использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 29213.

### **Микроскопические методы исследования**

Изучение кремнийорганических нисом проводилось на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия), отдельные этапы экспериментов выполняли с помощью световой микроскопии. Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа (Carl Zeiss, Германия, объектив PlanApo S 1,0 × FWD 60 mm; окуляр PI 10 x 23 Br foc). Окрашенные мазки просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр PI 10 × 23 Br foc (Carl Zeiss, Германия)).

### **Хромато-масс-спектрометрические методы исследования**

Эндогенные антимикробные пептиды выделяли по оригинальной методике из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров (Патент на изобретение №2729016 от 04.08.2020). Проводили ферментативный гидролиз стерильным раствором трипсина (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия). На 100 мл гидролизуемой смеси добавляли 10 мл трипсина в растворе фосфатного буфера pH 7,4. Осветляли полученный гидролизат, добавляя 0,6 % перекись водорода. В дальнейшем проводили разделение компонентов на фракции с использованием хроматографической колонки с краном и фильтром (Симакс ЧСН ИСО 3585, Россия). Для гель-фильтрации на поверхность фильтра наносили 1,5 г Сефадекса G-25 с последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через бактерицидные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Выделяли фракцию с антибактериальными пептидами массой 3-5 кДа, пропуская через гель раствор фосфатного буфера pH 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия). Для выделения

более полной фракции эндогенных низкомолекулярных пептидов использовали измельчённую гомогенизированную ткань плаценты животного происхождения. Проводили трипсинизацию и выделение АМП методом жидкостной хроматографии на разделительной колонке с использованием Сефадекса G-25.

#### **Иммунологические методы исследования**

Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF- $\alpha$  в слезной жидкости животных определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкции производителя.

#### **Биотехнологические методы исследования**

Полученные ранее низкомолекулярные плацентарные пептиды (Базиков И.А. и соавт., 2019) и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры - кремнийорганические ниосомы. В дальнейшем получение ниосомальных гелей проводилось по оригинальной запатентованной технологии (Патент на изобретения РФ № 2655522).

#### **Гистологические методы исследования**

После энуклеации глаза применяли фиксацию в 10%-ном растворе формалина, обезвоживание в спиртах, заливку в парафин. Срезы толщиной 10-12 мкм получали на микротоме (Микротом санный НМ 430, механический, Thermo FS, Россия). При окраске использовали гематоксилин-эозин по Ван-Гизону. Микроскопию полученных препаратов осуществляли при увеличении 150, 200, 400 раз с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» (Германия).

#### **Клинические методы исследования**

Все исследования выполнялись на базе офтальмологического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ставропольского края «Ставропольская краевая клиническая больница» и включали сведения анамнеза (возраст, пол, анамнез, преморбидные состояния, наличие хронических заболеваний, вакцинальный статус), время появления осложнений ожогов и их дальнейшая динамика, проводившееся лечение в амбулаторных условиях, данные объективного осмотра пациентов, результаты лабораторных и инструментальных методов обследования.

#### **Статистические методы исследования**

Для статистической обработки применяли следующие программы: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., США). Оценка достоверности различий между сравниваемыми величинами проводилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверность различий принималась при  $P \leq 0,05$ . Среднее арифметическое (M) и ошибка среднего (SEM) использовалась для нормального распределения показателей.

#### **Личное участие автора в получении результатов**

Автор самостоятельно провел анализ современных литературных источников, касающихся темы диссертации, с учетом чего разработаны дизайн исследования, протоколы экспериментов и описаны полученные результаты. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии в планировании и выполнении всех этапов работы. Автор принимал участие в заборе биологического материала и подготовки его к микробиологическим и иммунологическим исследованиям. Бактериологические исследования проведены на базе бактериологической лаборатории подготовки специалистов СтавНИПЧИ Роспотребнадзора совместно с д.м.н. Таран Т.В. Технология получения антимикробного ниосомального геля разработана в лаборатории нанотехнологии лекарственных средств СтГМУ совместно с к.б.н. Мальцевым А.Н. и м.н.с. Седых О.И. Доклинические исследования разработанного препарата выполнены в лаборатории фармакологии Научно-инновационного центра СтГМУ совместно с д.м.н., профессором Бейер Э.В. Гистологические исследования проводили в патоморфологической лаборатории СтГМУ с участием д.м.н., профессора Боташевой В.С. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, активное участие в написании обзорных и оригинальных статей по теме

диссертации.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Бактериологические исследования позволили установить преобладание в структуре выделенных возбудителей *Staphylococcus epidermidis* - 75,1 %, что определяет их доминирующую роль в этиологии инфекционных осложнений при ожогах глаза.
2. Диффузионный метод и метод микроразведений в бульоне продемонстрировал высокую антимикробную активность выделенных эндогенных дефензинов, значительно превышающую традиционно применяемые антимикробные препараты.
3. Разработанный подход по выделению эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови позволил получить ниосомальный гель для лечения ожогов глаз, инфицированных микроорганизмами способствующий эффективной эпителизации и сокращению сроков лечения.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов, представленных в работе, подтверждается достаточным объёмом, использованием современных методов исследования, а также высокотехнологичным оборудованием, имеющим сертификаты качества, свидетельства и аттестаты о метрологической поверке. Анализ экспериментальных данных был выполнен с использованием современного программного обеспечения и критериев статистического анализа. Применялись следующие методы исследования: классический бактериологический, иммунологический, биотехнологический с использованием нанотехнологий, экспериментальные исследования на животных, гистологический, клинический, статистический.

Работа выполнена в соответствии с планом научных работ Ставропольского государственного медицинского университета по теме: «Разработка трансдермальных препаратов с использованием ниосом - нановезикул кремнийорганической природы», номер государственной регистрации НИР: 01201372386.

Апробация диссертации проведена на совместном заседании коллективов кафедры микробиологии и кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский Университет» Министерства здравоохранения РФ (протокол кафедрального заседания № 11 от 30.05.2022 г).

Основные результаты выполненного диссертационного исследования были представлены на международных и всероссийских научных конференциях: «Биотехнология: взгляд в будущее» (2017, 2018, 2019, 2020 гг., г. Ставрополь), V Национальном Конгрессе бактериологов (2019 г., г. Москва).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых изданиях, 1 статья – в другом издании, 1 тезис - в рецензируемом издании, 8 тезисов - в материалах конференций.

#### **Объем и структура диссертации**

Материалы диссертационной работы изложены на 128 страницах машинописного текста и иллюстрирована 16 рисунками и 20 таблицами. Диссертация состоит из введения, описания материалов и методов исследования, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающий 229 источников, из них 113 отечественных и 116 зарубежных источников.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

#### **Исследования микрофлоры у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы**

Количество и частоту выделения микроорганизмов из конъюнктивальной полости регистрировали у здоровых лиц (контроль) и у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы. Материалом для бактериологического исследования служила слезная жидкость. Под наблюдением находились 100 пациентов с химическими ожогами

различной локализации и этиологии, в том числе мужчин – 52 (52%), женщин – 48 (48%). Возраст пациентов варьировал от 18 до 79 лет (средний  $44,3 \pm 1,9$  лет). Выборка больных была сформирована в соответствии с критериями включения и исключения.

Из слёзной жидкости больных с химическими ожогами выделено и идентифицировано 100 культур микроорганизмов, изучены их основные биологические свойства. Результаты проведенных бактериологических исследований показали (Рисунок 1), что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной, здоровой роговицей) имел следующий состав: *S. epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.* - 14 (14%), *S. aureus* - 4 (4%), *E. coli* – 3 (3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *S. haemolyticus* - 3 (3%), *S. pneumoniae* - 2 (2%), бактерии не выявлены – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%).

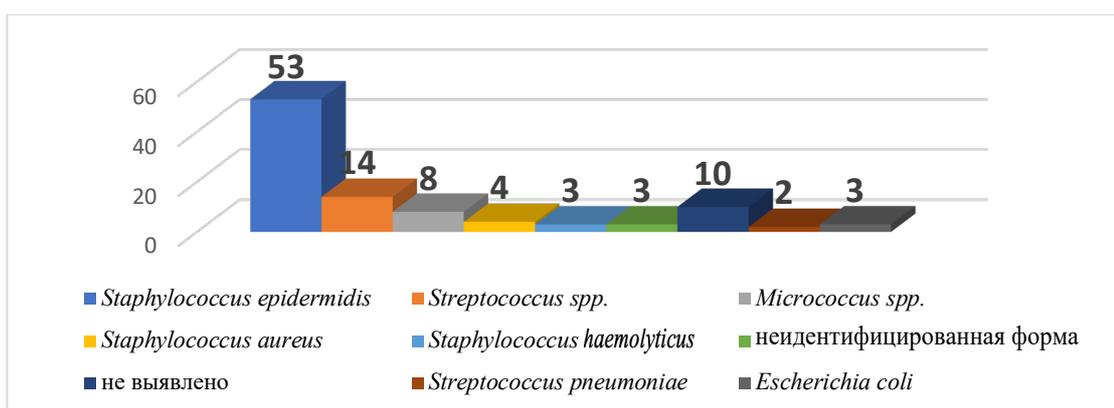


Рисунок 1 - Нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы

У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы (Рисунок 2) наблюдалось нарушение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза и контаминация такими патогенными микроорганизмами, как патогенные штаммы стафилококков, которые способствовали созданию благоприятной почвы для наслоения кандидозной инфекции. Грамположительная флора встречалась в 96%: *S. epidermidis* - 76%; *S. aureus* – 14%; *Streptococcus spp.* – 4%; *Enterococcus spp.* – 2%; грамотрицательная микрофлора: *Enterobacteriaceae spp.* – 2%. Среди грибов: *Candida spp.* – 2%.

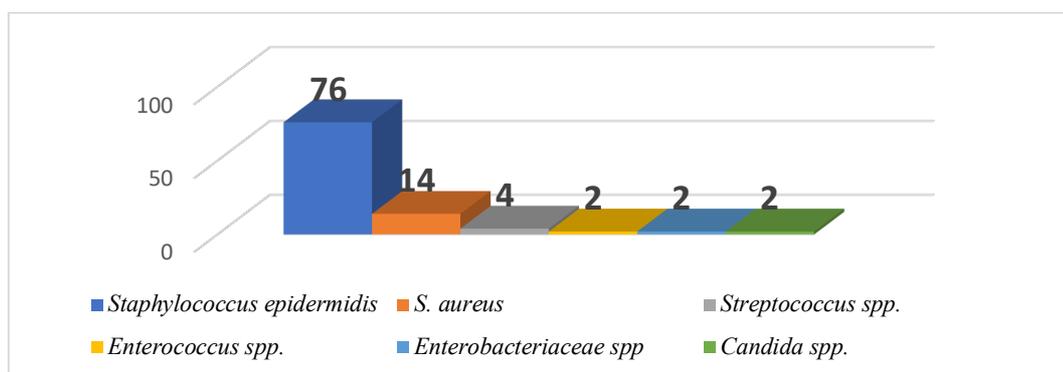


Рисунок 2 - Микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов

### Технология получения антимикробного ниосомального геля с пептидами

Полученные нами по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды имели сигналы в диапазоне 2000 - 10500 Da (Рисунок 3). У фракций с молекулярной массой

пептидов менее 2000 Da длина пептидной цепи не превышала 20-30 аминокислотных остатков. Низкомолекулярные плацентарные пептиды имели пептидные цепи 20 - 200 аминокислотных остатков. Характер сигнала и данные масс-спектрометрии образца свидетельствовали о том, что эта фракция соответствует группе сигналов на масс- спектрах с  $m/z$  около 6000 Da (Рисунок 4, Таблица 1). Полученные результаты коррелировали с данными масс-спектрометрического исследования. Результаты позволили установить наличие, помимо компонентов с молекулярной массой до 6000 Da, дополнительно ещё компоненты с относительно дискретной высокомолекулярной фракцией белков. Пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Da представляют собой цитомедины.

Полученные данные масс-спектрометрического анализа и эксклюзивной хроматографии позволяют сделать вывод о преимущественном содержании пептидов с низкой молекулярной массой (около 6000 Da). Это свидетельствует о наличии ценных биологически-активных компонентов факторов роста, цитокинов и других веществ, способствующих регенерации и пролиферации клеток. Выделяли фракцию с антибактериальными пептидами массой 3-5 кДа, пропуская через гель раствор фосфатного буфера рН 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия).

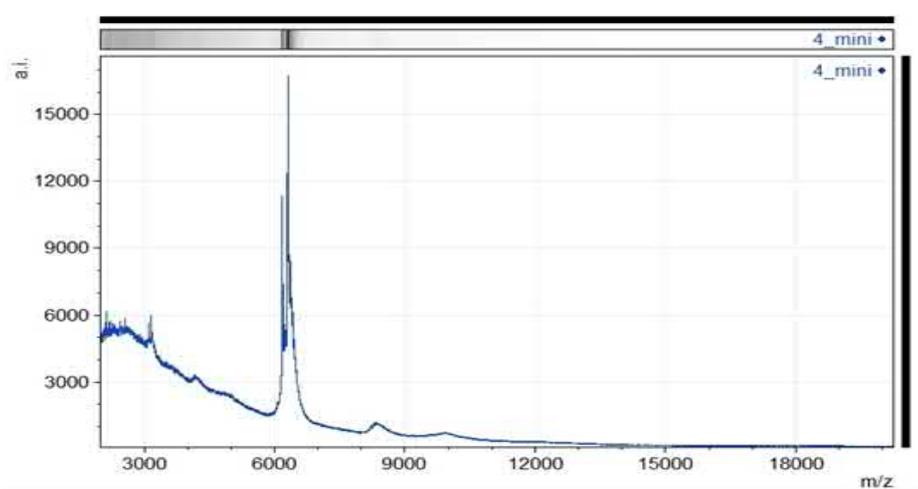


Рисунок 3 - Данные масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных плацентарных пептидов

Устанавливали длину волны 214 нм, позволяющую определить максимальную концентрацию антимикробных пептидов. Фосфатный буфер рН 7,4 выступал в роли подвижной фазы со скоростью подачи 150 мм<sup>3</sup>/мин. Калибровочную кривую выстраивали, применяя стандарт дефензина-альфа 1. Этот препарат брали из диагностических наборов для ИФА компании Cloud-Clone Corp.(США)

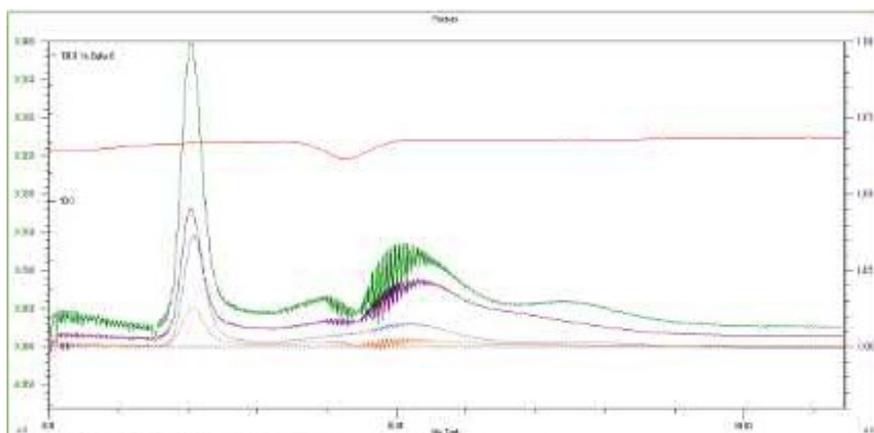


Рисунок 4 - Хроматограмма низкомолекулярных плацентарных пептидов

*Примечание:* кривые на хроматограмме: красная – проводимость ПФ, зеленая – детекция при 280 нм, фиолетовая – 260 нм, синяя – 214 нм, оранжевая – 410 нм

Таблица 1 - Основные характеристики сигналов на хроматограмме низкомолекулярных плацентарных пептидов

№ п/п	Пик (группа пиков) на хроматограмме, среднее время удерживания, мин.	Высота пиков, AU (280 нм)
1.	13,5 мин.	0,040
2.	около 23 мин. (гр. сигналов)	0,005
3.	около 32 мин. (гр. сигналов)	0,012
4.	около 51 мин. (гр. сигналов)	0,004

Выделенные из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы антимикробные эндогенные пептиды представляли собой дефензины-альфа. Калибровочный график концентраций дефензин-альфа представлен на рисунке 5. Полученную фракцию еще раз стерилизовали фильтрацией через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 6 представлена хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки. Помимо дефензина-альфа, выделены и другие виды дефензинов в остаточном количестве, отражённые в таблице 2, где пик 1-фракция дефензина-альфа, а 2,3,4-фракции других дефензинов. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 7 представлена хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25. В таблице 3 отображены данные хроматограммы после промывки регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25.

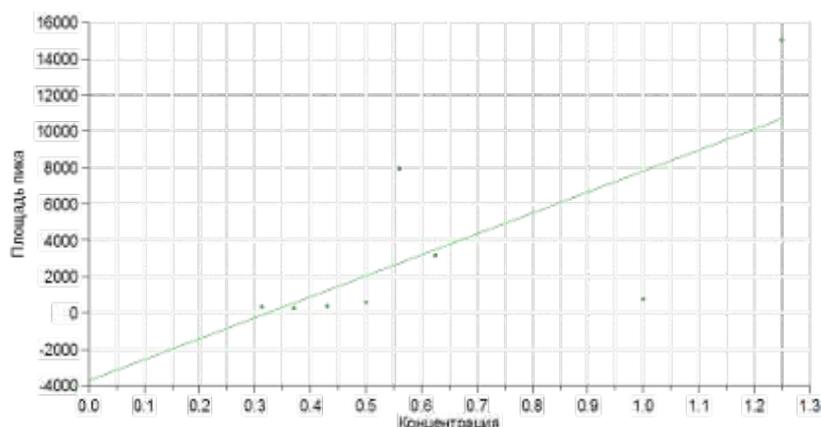


Рисунок 5 - Калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1)

*Примечание:* по оси абсцисс указана концентрация АМП, а по оси ординат – площадь пика

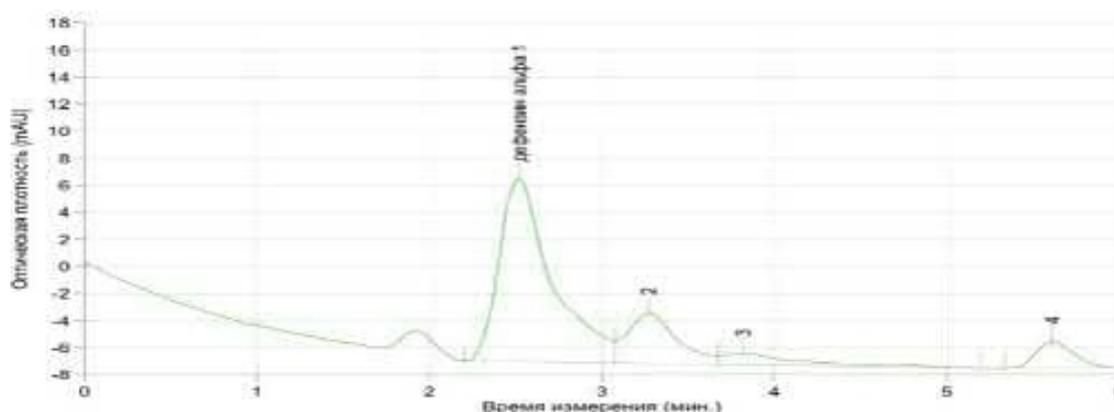


Рисунок 6 - Хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки

*Примечание:* по оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат оптическая плотность (mAU) массы крови, (пик 1-фракция дефензина альфа, а пики 2,3,4-фракции других дефензинов в остаточном количестве)

Таблица 2 - Данные хроматограммы после промывки без использования разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Пик	Время (мин)	Компонент	Конц. (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	2.52	дефензин-альфа 1	0.038	13.503	288.288	16.907
2	3.27			3.748	74.265	18.617
3	3.82			0.816	26.851	21.490

Во внутренний объём ниосом инкапсулировали активную субстанцию – выделенные с помощью жидкостной хроматографии пептиды. Пептиды, обладающие тропностью к ПЕГ-12 диметикону (липидной природы), иммобилизовались в ниосомы при ультразвуковом воздействии.

В последующем, выделяли более полную фракцию эндогенных низкомолекулярных пептидов, содержащих дефензины-бета с широким комплексом антимикробных пептидов и повышенной биологической ценностью. Поставленная задача достигалась использованием измельчённой гомогонизированной ткани плаценты животного происхождения, проведением трипсинизации и выделением АМП методом жидкостной хроматографии на разделительной колонке с использованием Сефадекса G-25. Использование разделительной колонки позволило получить фракцию с содержанием дефензин- бета 1 -  $77.095 \pm 6,4$  (нг/мл), что увеличило его содержание во фракции более чем в 10 раз по сравнению с прототипом. Определение содержания дефензина - бета в гидролизате плаценты проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Из 10 г исходного сырья плацентарной ткани получали 500 мл фракции с концентрацией 77.095 (нг/мл).

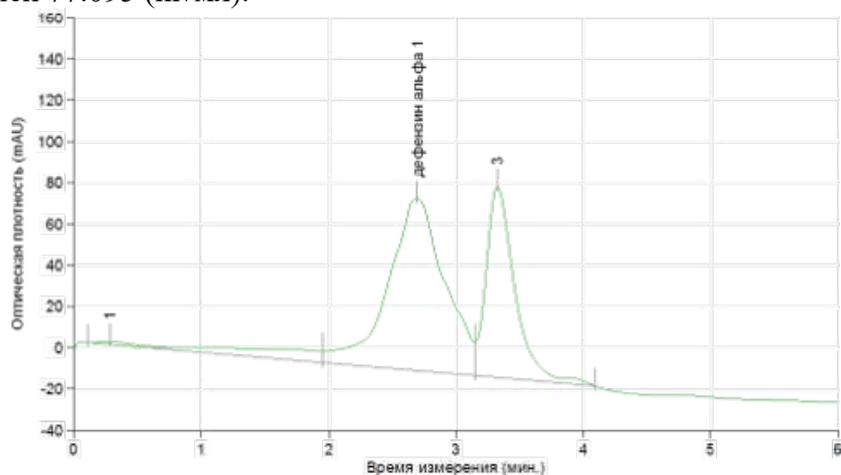


Рисунок 7 - Хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Таблица 3 - Данные хроматограммы после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Пик	Время (мин)	Компонент	Конц. (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	0.28			1.249	297.730	17.732
2	2.69	Дефензин-альфа 1	0.335	83.363	2574.624	27.460
3	3.32			92.425	1454.809	13.406

Конструирование геля заключалось в иммобилизации выделенных низкомолекулярных плацентарных и антимикробных эндогенных пептидов в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы, обладающие доказанной высокой проникающей способностью. Данная рецептура позволяет снизить терапевтическую дозу и повысить эффективность за счет увеличения биодоступности препарата и пролонгированности высвобождения. Инкапсулирование

выделенных пептидов в кремнийорганические нiosомы, обладающие наноразмером и значительной проникающей способностью, позволяет им беспрепятственно проникать в роговицу и пролонгировать терапевтический эффект. Отработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного нiosомального геля с выделенными пептидами. Полученные результаты показали, что оптимизированная технология выделения эндогенных низкомолекулярных пептидов перспективна для дальнейшего создания фармацевтических композиций.

### Оценка антимикробного действия дефензинов диско-диффузионным методом и методом микроразведений в бульоне

Перед началом экспериментов на животных с целью определения терапевтического эффекта разработанного опытного образца антимикробного нiosомального геля предварительно были проведены оценочные исследования *in vitro* антимикробной активности выделенных дефензинов-альфа и -бета в сравнении с цефалоспорином 5-го поколения - цефтаролином, используемом в качестве контроля по отношению к исследуемым штаммам микроорганизмов.

Чувствительность выделенных микроорганизмов определялась с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) на агаре Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с использованием стандартизированных дисков (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), пропитанных выделенными дефензинами-альфа и -бета в различной концентрации и цефтаролину (ACS DOBFAR, S.p.A. (Италия).

На начальных этапах данного исследования был проведён контроль качества используемой в экспериментах питательной среды – агара Мюллера-Хинтон – значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов в соответствии с методологией EUCAST (Таблица 4). Диско-диффузионным методом определяли чувствительность 2 контрольных штаммов (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) к цефтаролину (5 мкг/диск).

Данные, представленные в таблице 3, подтверждают соответствие качества используемого агара Мюллера-Хинтон (АМХ) требованиям, предъявляемым EUCAST. Интерпретация результатов экспериментов позволяет оценить категории для контрольных тест-штаммов как «чувствительные» к цефтаролину. Интерпретационные таблицы EUCAST [11] содержат «Пограничные значения диаметров зон подавления роста для определения клинических категорий чувствительности бактерий к антибиотикам», где для результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом стафилококков и кишечной палочки к цефтаролину (при содержании цефтаролина 5 мкг/диск) предусмотрены следующие значения оценочных категорий:

- Стафилококки, зоны задержки роста: чувствительные (Ч)  $\geq 20$  мм, резистентные (Р)  $< 17$  мм;
- Кишечная палочка, зоны задержки роста: Ч  $\geq 23$  мм, Р  $< 23$  мм.

Таблица 4 - Значения допустимых значений диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с цефтаролином – контроль качества питательной среды (агар Мюллера-Хинтон)

Антимикробный агент, мкг/диск	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	Допустимые значения, мм	Полученные значения, мм	Допустимые значения, мм	Полученные значения, мм
Цефтаролин, 5 мкг	24-30	25±1	24-30	25±1

В соответствии с этими данными оценивали результаты экспериментов, представленные в таблице 5, с точки зрения оценочных категорий чувствительности штаммов к цефтаролину и, косвенно, к дефензинам-альфа и -бета. Средние результаты пятикратного повтора экспериментов по определению чувствительности изучаемых штаммов бактерий (значений диаметров зон подавления роста) к цефтаролину и дефензинам-альфа и -бета диско-диффузионным методом

представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Результаты определения чувствительности исследуемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* к антимикробным агентам (АМА)

АМА, мкг/диск	<i>S. aureus</i> , зона задержки роста, мм					
	чувствительные*	<i>S. aureus</i> АТСС 29213	<i>S.</i> <i>aureus</i> 1з	<i>S.</i> <i>aureus</i> 2з	<i>S.</i> <i>aureus</i> 1б	<i>S.</i> <i>aureus</i> 2б
Цефтаролин 5 мкг	≥ 20 мм	25±1	23±1,8	24±1,4	24±1,6	23±1
Дефензин- альфа, 5 мкг	–	35±1,7	36±1,1	35±1,7	37±1,7	35±1,9
Дефензин- бета, 5 мкг	–	40±0,7	39±0,4	41±0,2	40±0,8	41±0,7
Контроль, «пустые» диски, мм	–	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> , зона задержки роста, мм						
	чувствительные*	<i>E. coli</i> АТСС 25922	<i>E. coli</i> 1з	<i>E. coli</i> 2з	<i>E. coli</i> 1б	<i>E. coli</i> 2б
Цефтаролин 5 мкг	≥ 23 мм	25±1,0	24±0,9	25±1,1	25±1,9	25±1,2
Дефензин- альфа, 5 мкг	–	34±1,2	36 ±1,7	36 ±1,7	35 ±1,3	36±1,1
Дефензин-бета, 5 мкг	–	39 ±1,1	40 ±1,3	41 ±1,0	38 ±0,5	40 ±1,1
Контроль, «пустые» диски, мм	–	0	0	0	0	0

\* – в соответствии с EUCAST (вер. 2.0, 2011 г., <http://www.eucast.org>)

Примечание: штаммы *S. aureus* 1з – от здоровых людей; *S. aureus* 2з – от здоровых людей; *S. aureus* 1б – от больных людей; *S. aureus* 2б – от больных людей; *E. coli* 1з – от здоровых людей; *E. coli* 2з – от здоровых людей; *E. coli* 1б – от больных людей; *E. coli* 2б – от больных людей.

Из данных таблицы 5 следует, что все изученные штаммы были чувствительны к цефтаролину, однако дефензин-альфа и дефензин-бета в этих экспериментах показали значительно более выраженную активность по отношению к изучаемым штаммам в сравнении с цефтаролином в аналогичных концентрациях. Используемые в качестве контроля свободные от антимикробных агентов, «пустые» диски, не обладали антибактериальной активностью.

Результаты экспериментов по определению значения диаметров зон подавления роста, представленные в таблице 5, позволяют сделать вывод о значительно более высокой чувствительности тестируемых штаммов (*E. coli* АТСС 25922, *E. coli* изоляты из слезной жидкости здоровых людей, *E. coli* клинические изоляты, *S. aureus* АТСС 29213, *S. aureus* изоляты из слезной жидкости здоровых людей, *S. aureus* клинические изоляты) к дефензину- альфа и дефензину-бета по сравнению с цефалоспорином 5-го поколения – цефтаролином (Рисунок 8).

Результаты этого «качественного» эксперимента легли в основу планирования дизайна последующих «количественных» исследований – определения МПК дефензинов-альфа и бета в сравнении с МПК цефтаролина для исследуемых штаммов микроорганизмов (Рисунок 9). Повышение концентрации дефензинов-альфа и -бета до 10 мкг/диск существенно не изменяли антимикробную активность изучаемых эндогенных дефензинов (Рисунок 10). В связи с чем можно сделать вывод, что применение эндогенных дефензинов в дозе 5 мкг обладает достаточной активностью в отношении клинического штамма *S. aureus*.

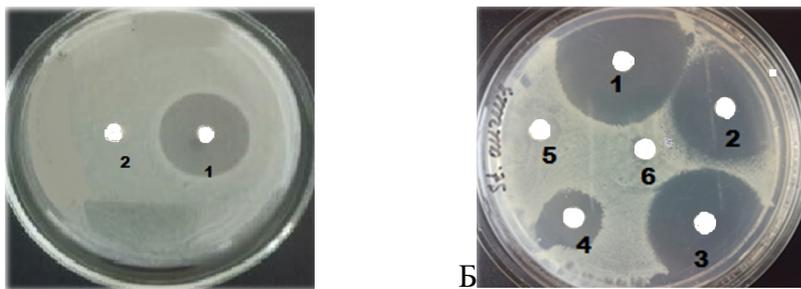


Рисунок 8 -Зоны задержки роста *S. aureus* ATCC 29213 и *E. coli* ATCC 25922

Примечание: А: 1-диск с дефензином-альфа (5 мкг/диск), 2 – «пустой» диск без антимикробного агента (контроль) на чашке Петри с газоном *E. coli* ATCC 25922;

Б: 1 и 3 – диски с дефензином-бета, 5 мкг/диск; 2-диск с дефензином-альфа, 5 мкг/диск, 5, 6- диски без антимикробных агентов (контроль) на чашке Петри с посевом *S. aureus* ATCC 29213

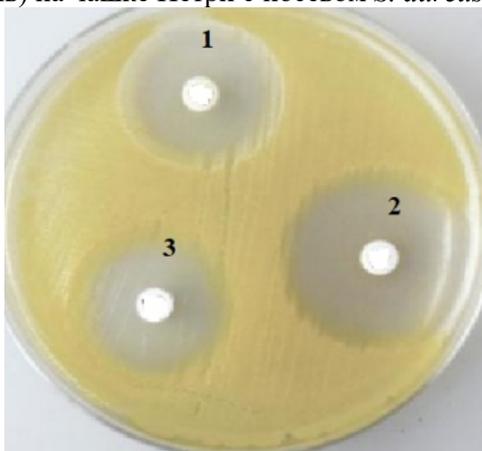


Рисунок 9 – Зоны задержки роста *S. aureus* (клинический штамм)

Примечание: 1 – диск с дефензином-альфа, 5 мкг/диск; 2 – диск с дефензином-бета, 5 мкг/диск; 3– диск с цефтаролином, 5 мкг/диск

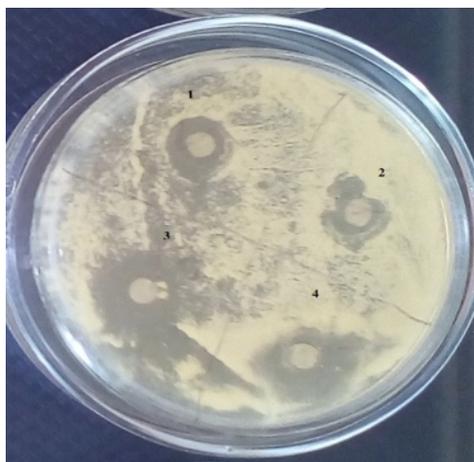


Рисунок 10 – Зоны задержки роста *S. aureus* (клинический штамм)

Примечание: 1 – диск с дефензином-альфа, 5 мкг/диск; 2 – диск с дефензином-альфа, 10 мкг/; диск 3 - диск с дефензином-бета, 5 мкг/диск; 4 - диск с дефензином-бета, 10 мкг/диск

При использовании метода микроразведений в бульоне оценивали результаты исследования по определению МПК антимикробных агентов изучая чувствительность тестируемых штаммов к цефтаролину и, косвенно, судили об активности дефензинов-альфа и -бета в отношении указанных микроорганизмов в сравнении с цефтаролином.

Выявлено, что все тестируемые штаммы *S. aureus* и *E. coli* обладали чувствительностью к цефтаролину и дефензинам-альфа и -бета. При этом в аналогичных концентрациях МПК дефензина-альфа и, особенно, дефензина-бета были в 2-4 раза ниже по сравнению с аналогичным

показателем для цефтаролина.

В таблице 6 представлены сводные результаты определения МПК антимикробных агентов (АМА) – цефтаролина, дефензина-альфа и -бета в отношении изучаемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* с приведением значений оценочной категории «чувствительные» для этих бактерий в соответствии с EUCAST в отношении антибиотика цефтаролина.

Таблица 6 - Сводные результаты определения чувствительности исследуемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* к антимикробным агентам (АМА)

АМА	штаммы <i>S. aureus</i> , МПК, мкг/мл					
	чувствительные*	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> 1з	<i>S. aureus</i> 2з	<i>S. aureus</i> 16	<i>S. aureus</i> 26
Цефтаролин	≤ 1 мкг/мл	1	1	1	1	0,5
Дефензин-альфа	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Дефензин-бета	–	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
Контроль, «пустые» диски,	–	0	0	0	0	0
штаммы <i>E. coli</i> , МПК, мкг/мл						
	чувствительные*	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> 1з	<i>E. coli</i> 2з	<i>E. coli</i> 16	<i>E. coli</i> 26
Цефтаролин	≤ 0,5 мкг/мл	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5
Дефензин-альфа	–	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25
Дефензин-бета	–	0,125	0,06	0,125	0,125	0,125
Контроль, «пустые» диски,	–	0	0	0	0	0

\* – в соответствии с EUCAST (вер. 2.0, 2011 г., <http://www.eucast.org>).

Примечание: штаммы *S. aureus* 1з – от здоровых людей; *S. aureus* 2з – от здоровых людей; *S. aureus* 16 – от больных людей; *S. aureus* 26 – от больных людей; *E. coli* 1з – от здоровых людей; *E. coli* 2з – от здоровых людей; *E. coli* 16 – от больных людей; *E. coli* 26 – от больных людей.

Из данных, приведённых в таблице 6 следует, что все тестируемые штаммы были чувствительны к цефтаролину в соответствии с оценочными категориями EUCAST. Однако МПК дефензинов-альфа и -бета свидетельствуют об их более высокой антибактериальной активности в аналогичных концентрациях по сравнению с таким эффективным антибиотиком как цефалоспорин 5 поколения – цефтаролин. Эти данные демонстрируют высокую антимикробную активность дефензинов по отношению к клиническим штаммам стафилококков и кишечной палочки, выделенным от людей при различных патологических состояниях.

Таким образом, результаты проведённых экспериментов показали, что выделенные эндогенные антимикробные пептиды обладают выраженной противомикробной активностью в отношении изученных штаммов *S. aureus* и *E. coli* (контрольных штаммов; штаммов, выделенных от здоровых людей; штаммов, выделенных из слёзной жидкости у пациентов с химическими ожогами роговицы). Следовательно, дефензины-альфа и -бета являются антимикробными агентами широкого спектра действия – активны как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

#### **Изучение токсичности антимикробного нносомального геля с пептидами**

Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов весом 2,1–2,3 кг. Экспериментальным путем и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (2012) была подобрана терапевтическая доза (ТД), обеспечивающая равномерное

распределение в поражённой области. В расчёт дозы антимикробного ниосомального геля брали также оптимальное содержание ниосом в геле. Исходя из этого был определен исследуемый диапазон доз с необходимой терапевтической концентрацией (10%). В течение 2 недель проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, а также проявлением симптомов интоксикации. При изучении безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами исследован диапазон переносимых, токсических и летальных доз антимикробного ниосомального геля. Применение геля не привело к гибели экспериментальных животных и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций.

### **Уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы**

Для изучения действия разработанного антимикробного ниосомального геля на течение регенерации инфицированных химических ожогов роговицы исследовали цитокиновый статус у экспериментальных животных. Исследования выполнены на кроликах, разделенных на 3 группы: 1 – интактные; 2 – лабораторные животные с инфицированным щелочным ожогом, без лечения (контроль); 3 – лабораторные животные с инфицированным щелочным ожогом, которым наносили ниосомальный антимикробный гель с пептидами. У животных 2 и 3 групп вызывали щелочной ожог III-B степени. Животным 3 группы сразу после химического воздействия и последующего инфицирования в течение всего периода эксперимента (28 суток) на обожженную поверхность роговицы наносили тонким слоем ниосомальный антимикробный гель. На 3, 7, 14, 21 и 28-е сутки проводили визуальное наблюдение за течением раневого процесса и определяли уровень цитокинов. В целом, инфицированный химический ожог сопровождался длительным повышением провоспалительных цитокинов в крови (IL-1 $\beta$  на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней). Повышение уровня цитокинов сопровождалось замедлением заживления ожоговой раны. Роль провоспалительных цитокинов в антибактериальном механизме подтверждена данными, полученными в результате применения ниосомального антимикробного геля с пептидами. Его применение сокращало период цитокиновой активности при нормализации концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, а TNF- $\alpha$  – на 21 сутки. Это сопровождалось ускорением процессов заживления инфицированного химического ожога. В результате проведенного исследования было показано, что у животных с инфицированным ожоговым поражением глаза, цитокины ИЛ-1  $\beta$  обнаруживаются в количестве 48+9,3 пкг/мл в 100% случаев, в то время как в норме его нет. ФНО-  $\alpha$  был обнаружен во всех группах, причём его концентрация не отличалась от нормальных показателей. В целом, при инфицированных химических ожогах выявлен дисбаланс цитокиновой системы с преобладанием провоспалительных цитокинов. При ожоге происходило повреждение тканей глаза. Это стимулировало выработку ИЛ-1, так как этот цитокин является регулятором воспаления в организме. Понижение концентрации ФНО- $\alpha$  в слёзной жидкости животных с ожоговым поражением глаза объяснялось тем, что наступало повреждение кератоцитов, являющихся их продуцентами.

### **Результаты гистологического исследования эффективности лечения ожогов антимикробным ниосомальным гелем в эксперименте**

Создавалась модель щелочного ожога глаза у кроликов. Эксперименты проведены на 30 кроликах породы шиншилла весом 2,1-3,5 кг, которым наносили антимикробный ниосомальный гель с выделенными пептидами для лечения инфицированных химических ожогов роговицы. Химический ожог получали с помощью 10% раствора едкого натра. Предварительно животным проводили анестезию 0,5% раствором дикаина. Через два часа оценивали степень ожога роговой оболочки и животных распределяли по группам. У кроликов отмечались химические ожоги роговицы 3 степени. Экспериментальные животные были разделены на три группы: одна опытная и две контрольные по 10 кроликов (20 глаз в каждой группе). Через 3 часа после фиксирования ожогов роговицы приступали к нанесению антимикробного ниосомального геля с пептидами.

После воспроизведения ожога и оценки тяжести состояния животным первой опытной группы осуществлялось лечение с помощью нанесения 0,05 мл антимикробного ниосомального геля с пептидами на ожоговую поверхность 1 раз в сутки. Для изучения антимикробной активности

разработанного ниосомального геля, животных опытной группы инфицировали наиболее часто встречающимся в клинической практике типовым лабораторным штаммом *S. aureus* ATCC 29213. Живую культуру наносили в стационарной фазе роста, разводили ее физиологическим раствором до 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> Мг/мл. Для заражения язвенной поверхности роговицы использовали 1 мл культуры. В первой контрольной группе животным проводили лечение 1% тетрациклиновой мазью в течение всего периода наблюдения. Другие животные из второй контрольной группы не получали никакого лечения. Для выведения кроликов из эксперимента в определённые планом исследования сроки проводили декапитацию. Энуклеацию осуществляли на 1, 3, 7, 10 и 30 сутки. Для гистологической оценки глаз животных использовали общепринятые методы. Энуклеированные глаза фиксировали в 10%-ном растворе формалина, обезвоживали в спиртах, заливали в парафин. Затем на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия) получали срезы толщиной 10-12 мкм, которые окрашивали гистологическим красителем гематоксилин – эозин (производство «AppliChem / Panreac», Испания) по Ван-Гизону. В дальнейшем с помощью светового микроскопа «Carl Zeiss» (Германия) осуществляли микроскопию полученных препаратов при увеличении 150, 200, 400 раз. После получения животными химических ожогов роговицы, через 3 часа начинали лечение антимикробным ниосомальным гелем.

До начала эксперимента гистологическая оценка показала, что роговица глаза кролика покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием (Рисунок 11А). Морфологическое определение признаков токсического действия продуктов распада поврежденных клеток показало, что через 3 суток от начала эксперимента эпителиальные клетки роговицы были увеличены в размерах (Рисунок 11Б). Между коллагеновыми волокнами появляются мелкоочаговые воспалительные инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов (Рисунок 11В). В краевой зоне роговицы наблюдается отек, полнокровие сосудов, стазы (Рисунок 11Г). На пятый день эксперимента эпителий роговицы характеризовался гидропической и баллонной дистрофией (Рисунок 11Д). В эти же сроки в собственной оболочке роговицы наблюдалось набухание эндотелия, сопровождающееся диффузным отёком (Рисунок 11Е).

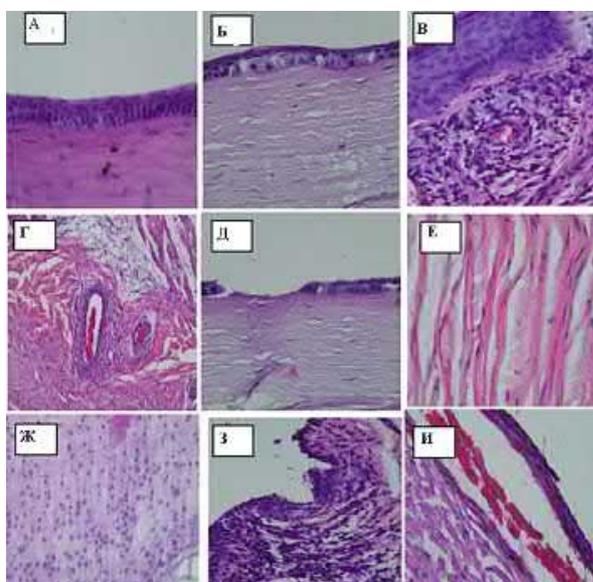


Рисунок 11 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога до лечения антимикробным ниосомальным гелем (микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10x - 200x, окраска гематоксилином и эозином)

*Примечание: А – нормальный плоский эпителий роговицы; Б – увеличение размеров эпителиальных клеток; В – появление воспалительных инфильтратов; Г – отек, полнокровие сосудов; Д – баллонная дистрофия эпителия; Е – диффузный отек эпителия; Ж – нарастание воспалительной инфильтрации; З – усиление дистрофических изменений; И – отслоение многослойного плоского эпителия*

Воспалительная инфильтрация нарастала и сопровождалась преобладанием полиморфно-клеточных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов (Рисунок 11Ж). Через 7 суток после химического ожога у интактных животных наблюдалось усиление дистрофических и деструктивных изменений (Рисунок 11З). За счёт отека происходило поднятие и отслоение многослойного плоского эпителия роговицы (Рисунок 11И). Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что щелочное повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления.

Через 7 суток после химического ожога у интактных животных наблюдалось усиление дистрофических и деструктивных изменений (Рисунок 11З). За счёт отека происходило поднятие и отслоение многослойного плоского эпителия роговицы (Рисунок 11И). Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что щелочное повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления.

Исследования динамики заживления ожогового дефекта роговицы показали, что применение антимикробного ниосомального геля в опытной группе способствовало уменьшению частоты формирования глубоких дефектов роговицы по сравнению с контролем. Так в нашем эксперименте на 3 день лечения наблюдалось восстановление целостности эпителиального пласта. В инфильтратах обнаруживались лимфоциты, плазматические клетки и немного нейтрофилов (Рисунок 12А). На 5-е сутки лечения кератита антимикробным ниосомальным гелем патологические изменения в роговице были купированы (Рисунок 12Б). Отмечалась полная регенерация эндотелия роговицы (Рисунок 12В). В данный период лечения отек собственной оболочки значительно уменьшился, отмечалось набухание коллагеновых волокон, но очаги деструкции не обнаружены (Рисунок 12Г). На 7-е сутки лечения химического ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем в роговице глаза кролика наблюдалось вращание сосудов в роговицу при воспалительном процессе (Рисунок 12Д). Вращание сосудов и нервов после повреждения, в том числе, и после ожогов, имело значительное влияние на процессы восстановления и дифференцировки эпителиальной и соединительной ткани роговицы (Рисунок 12Е). В опытной группе, в отличие от контрольной, к концу эксперимента отмечено восстановление прочных эпителиально-стромальных взаимоотношений.

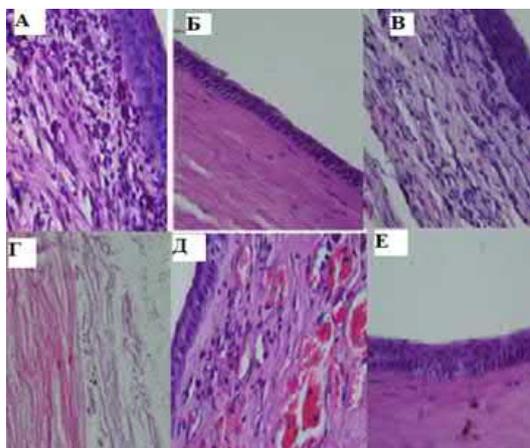


Рисунок 12 - Гистологические изменения роговицы при химическом ожоге после лечения антимикробным ниосомальным гелем (микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10х – 200х, окраска гематоксилином и эозином)

*Примечание: А – преобладание лимфоцитов, нейтрофилов, плазматических клеток; Б – купирование воспалительного процесса; В – полная регенерация эпителия; Г – уменьшение отека эпителия; Д – васкуляризация роговицы по лимбу; Е – профиль роговицы после полного восстановления*

Таким образом, в ходе проведенного экспериментального исследования показано, что в тканях имели место деструктивные и воспалительные процессы. Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы выделенных пептидов геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения,

восстанавливая дефекты более глубоких слоев эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции.

### **Изучение регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте**

Щелочной ожог сопровождался признаками роговичного синдрома: блефароспазмом, светобоязнью, слезотечением. Повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления. Применение 1% тетрациклиновой мази ускорило и стимулировало регенерацию (восстановление) поврежденной роговицы и конъюнктивы при химическом ожоге на 10 день эксперимента.

В результате проведенной работы было показано, что химический ожог вызывает гидролиз структуры белка и разрушение клеток, приводя к некрозу тканей. Наблюдается гидратация, с последующим помутнением стромы роговицы и трабекулярной сети, что при увеличении выработки факторов воспаления может привести к потере зрения. Использование ниосомального геля ускорило и стимулировало регенерацию поврежденной роговицы и конъюнктивы намного эффективнее по сравнению с 1% тетрациклиновой мазью.

Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы активных веществ ниосомального геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции.

Таким образом, при изучении регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте установлено более раннее начало эпителизации, сокращение в 2,2 раза сроков лечения, а также снижение количества осложнений в 2,8 раза, причем васкуляризация роговицы уменьшилась с 81,2 % (при традиционной терапии) до 55,3 % случаев.

### **ВЫВОДЫ:**

1. У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими микроорганизмами, как патогенные штаммы стафилококков, которые способствовали созданию благоприятных условий для присоединения кандидозной инфекции. Грамположительная микрофлора встречалась в 96%, грамотрицательная - в 2% и грибы – в 2%.
2. Разработана технология выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных пептидов, их инкапсулирование в кремнийорганические ниосомы, что позволило получить гель, обеспечивающий пролонгированную эффективную доставку пептидов в зону очага инфицированного ожога.
3. Микробиологические исследования ниосомального геля с пептидами в диско-диффузионном методе и методе микроразведений продемонстрировали его антимикробную активность, превышающую в 2,8 раз традиционно применяемую 1% тетрациклиновую мазь.
4. Результаты исследований безопасности полученного ниосомального геля на разных группах животных свидетельствовали об отсутствии его токсичности.
5. Изучение уровня цитокинов в слезной жидкости показало их роль в процессе ранозаживления, патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы продемонстрировали синергию антимикробного и регенераторного действия ниосомального геля, проявленную в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны и восстановлению гистологической структуры.
6. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства при экспериментальных химических ожогах способствовало более раннему началу эпителизации, сокращению сроков лечения - в 2,2 раза. При использовании геля выявлено снижение количества осложнений в 2,8 раза, причем васкуляризация роговицы уменьшилась с 81,2 % (при традиционной терапии) до 55,3 % случаев.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При выделении *S. epidermidis* из переднего отрезка глаза при ожогах роговицы целесообразно проводить бактериологические исследования чувствительности выделенных стафилококков к антимикробным препаратам и рассматривать эти микроорганизмы в качестве этиологических агентов инфекционных осложнений.

Выявление стафилококкового бактерионосительства следует рассматривать как фактор риска развития инфекционных осложнений при травмах и ожогах глаза. В случае резидентного носительства необходимо проведение санации роговицы с целью элиминации возбудителя.

Исследование уровня цитокинов в жидкости передней камеры глаза является критерием развития антибактериального механизма инфицированного ожога. Повышение уровня провоспалительных цитокинов характеризует благоприятное течение ранозаживления инфицированного ожога роговицы.

Доказанная антимикробная и регенераторная эффективность антимикробного ниосомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Теоретический и практический интерес представляют дальнейшие исследования по изучению эффекта синергии, продемонстрированные в усилении антимикробной и регенераторной эффективности при действии плацентарных пептидов и эндогенных дефензинов, выделенных из клеток крови.

Научный и практический интерес представляет дальнейшее изучение чувствительности контрольных, музейных и клинических штаммов различных микроорганизмов (бактерий, грибов и вирусов) к выделенным эндогенным дефензинам-альфа и -бета.

Антимикробные ниосомальные гели можно использовать локально, что позволяет избежать побочного эффекта системного применения. Однако, контролируемое высвобождение лекарств не может быть пока очень точным. В будущем эти проблемы все еще требуют решения при дополнительных исследованиях.

Влияние эндогенных пептидов на течение различных патологических процессов в слизистых и тканях других органов является перспективной темой для дальнейшего исследования.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Базиков, И.А.** Применение клеточных и нанотехнологий для разработки новых препаратов / **И.А. Базиков, М.М. Магонов, Э.М. Хатков, З.А., Сеираниду, А.Л. Гукасян, Н.И. Калинкина** // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** - 2013. - Т. 29, № 3. - С. 14–18.
2. **Базиков, И.А.** Эффективность офтальмологического регенеративного и антимикробного ниосомального геля «Регенерин» в эксперименте / **И.А. Базиков, Н.И. Малинина, А.Н. Мальцев, С.Р. Айтекова, В.В. Лукинова** // **Проблемы медицинской микологии.** - 2016. - № 2 (18). – С. 41.
3. **Базиков, И.А.** Серебрение разработанных кремнийорганических наноконтейнеров (ниосом) для адресной доставки лекарственных средств / **И.А. Базиков, М.А. Селимов, В.В. Лукинова, Н.И. Малинина** // **Евразийский Союз Ученых (ЕСУ).** – 2016. - № 3 (24), часть 2. - С. 36.
4. **Базиков, И.А.** Антимикробная активность модифицированных атомами серебра кремнийорганических ниосом / **И.А. Базиков, В.В. Лукинова, Н.И. Малинина, А.Н. Мальцев** // **Евразийский Союз Ученых (ЕСУ).** – 2016. - № 3 (24), часть 2. - С. 38.
5. **Малинина, Н.И.** Разработка технологии получения препарата на основе клеток плаценты для регенерации / **Н.И. Малинина** // **Биотехнология: Взгляд в будущее** // **Материалы II международной студенческой научно-практической конференции, 7 – 8 июня 2016 г., г. Ставрополь.** – Ставрополь, 2016. - С. 54.
6. **Базиков, И.А.** Изучение химического состава пептидов в составе ниосомального препарата «Регенерин» / **И.А. Базиков, А.Н. Куличенко, Д.А. Ковалев, А.Н. Мальцев, Н.И. Калинкина** // **Медицинский вестник Северного Кавказа.** - 2017. - Т. 12, № 2. - С. 176-180.

7. **Базиков, И.А.** Оценка эффективности применения офтальмологического ниосомального геля «Регенерин» в лечении химического ожога роговицы / **И.А. Базиков, В.С. Боташева, Н.И. Калинкина, А.Н. Мальцев, Н.Ю. Костюкова, Д.А. Доменюк** // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. - №13(2). – С. 216-220.
8. **Калинкина, Н.И.** Экспериментальные исследования эффективности сочетанного воздействия офтальмологического ниосомального геля «Регенерин» и электрофореза / **Н.И. Калинкина, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, В.С. Боташева** // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции, 27- 28 апреля 2018г. г.Ставрополь. - Ставрополь, 2018. - С.22-27.
9. **Калинкина, Н.И.** Роль иммунных клеток в ранозаживлении бактериальных осложнений щелочных ожогов роговицы при использовании ниосомального геля в эксперименте / **Н.И. Калинкина, И.А. Базиков** // В сборнике: Материалы V Национального конгресса бактериологов, 16-17 сентября 2019г., г. Москва. - Москва, 2019. - С.32.
10. **Калинкина, Н.И.** Изучение микрофлоры слизистых глаз у животных с бактериальными осложнениями щелочных ожогов роговицы / **Н.И. Калинкина, И.А. Базиков** // В сборнике: Материалы V Национального конгресса бактериологов, 16-17 сентября 2019 г.,г. Москва. – Москва, 2019. - С.33.
11. **Калинкина, Н.И.** Выделение микроорганизмов у пациентов с инфицированными ожогами роговицы/ **Н.И. Калинкина, И.А. Базиков, Мальцев А.Н.** // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 6 международной научно-практической конференции, 25-26 марта 2020г., г. Ставрополь. – Ставрополь, 2020. - С.48-51.
12. **Калинкина, Н.И.** Цитокиновый статус при инфицированном химическом ожоге роговицы // **Н.И. Калинкина, И.А. Базиков** // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 6 международной научно-практической конференции, 25-26 марта 2020г., г. Ставрополь. - Ставрополь, 2020. - С.51-53.
13. **Хералова, Н.И.** Эффект синергии эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов в составе ниосомального геля при лечении ожогов, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами / **Н.И. Хералова, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых, В.А. Батулин, Рамеш К. Гоял, Мадху Гупта, М.В. Рубайло, Д.Ю. Гуров**// Волгоградский научно-медицинский журнал. - 2020. - № 4. - С. 33-36.
14. **Базиков, И.А.** Антимикробная эффективность ниосомальных форм дефензинов при тепловом воздействии / **И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, Н.И. Хералова, В.А. Зеленский, А.А. Ефременко, М.В. Рубайло** // Астраханский медицинский вестник. - 2021. - № 2. - С. 37-44.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП - антимикробные пептиды  
 ВЭЖХ –высокоэффективная жидкостная хроматография  
 ВИЧ – вирус иммунодефицита  
 г - грамм  
 Гц - Герц  
 ДДМ – диско–диффузионный метод  
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
 ИЛ- интерлейкины  
 кДа – килодальтон  
 Мкл - микролитр  
 мкМ – микрометр  
 мл – миллилитр  
 НИР – научно–исследовательская работа  
 нм – нанометр

РФ – Российская Федерация

СтГМУ – Ставропольский государственный медицинский университет

США – Соединённые Штаты Америки

ТД – терапевтическая доза

ТУ – техническое условие

Да – дальтон

IL- интерлейкин