

На правах рукописи

Болатчиев Альберт Добаевич

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ
СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ И РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ
ДЕФЕНЗИНА ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ
ИНФИЦИРОВАННЫХ РАНАХ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград, 2020

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

Научный руководитель:

Батурин Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии с курсом ДПО Ставропольского государственного медицинского университета

Научный консультант:

Базиков Игорь Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Ставропольского государственного медицинского университета

Официальные оппоненты:

Рафальский Владимир Витальевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии, директор Центра клинических исследований Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Батищева Галина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» 2020 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «___» _____ 201 г.

**Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук**

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Прогрессирующее нарастание антибиотикорезистентности является глобальной угрозой человечеству, что отражено в международных документах Всемирной организации здравоохранения (Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254884/1/9789244509760-rus.pdf?ua=1> (Дата обращения: 20.04.2019). В Российской Федерации также принят ряд важнейших решений, направленных на обеспечение биологической безопасности страны, в том числе в связи с распространением антимикробной резистентности (Указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 № 97 "Об Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу" [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201903110045> (Дата обращения: 29.04.2019); Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30.03.2019 № 604-р "Об утверждении Плана мероприятий на 2019-2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года" [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201904090021> (Дата обращения: 29.04.2019).

Особенно ярко проблема антибиотикорезистентности проявляется при хроническом течении инфекционного процесса, например, у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС). Это связано с тем, что инфицированные язвы плохо поддаются лечению системными противомикробными средствами ввиду низкой чувствительности к препаратам, а также иммунодефицита и нарушений микроциркуляции при сахарном диабете (Chantelau E., 1996). Попытки усилить эффективность системной антибактериальной терапии с помощью местных противомикробных средств не всегда результативны (Dumville J.C., 2017). В связи с этим фармакотерапия СДС требует комплексного подхода с использованием системных антибактериальных средств и применением противомикробных препаратов местного действия. При этом выбор средств терапии системного и местного действия должен опираться на результаты мониторинга состава микроорганизмов, выделяемых из язвенно-некротических очагов, а также данные чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Таким образом, очевидна острая необходимость в поиске новых подходов к лечению СДС за счет разработки новых антибактериальных препаратов. Перспективными кандидатами на эту роль являются антимикробные пептиды – дефензины, обладающие широким спектром антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности (Suarez-Carmona M., 2015), к которым у бактерий не формируется резистентность (Pachón-Ibáñez M.E., 2017).

В связи с этим представлялось важным исследовать состав и чувствительность микроорганизмов к антибактериальным средствам при СДС, а также оценить фармакологические свойства дефензинов и на их основе разработать лекарственные препараты для местной противомикробной терапии.

Степень научной разработанности проблемы. Снижение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам приводит к увеличению продолжительности лечения, увеличению летальности, а также финансовых затрат (Rolain J-M., 2016). Рациональная антибиотикотерапия обеспечивается путем постоянного мониторинга изменений состава и антибиотикочувствительности микрофлоры, а научная разработанность данной проблемы в большинстве регионов России остается недостаточно высокой, что связано с отсутствием данных по локальной антибиотикорезистентности у пациентов с СДС.

Рост антибиотикорезистентности определяет высокую потребность в новых противомикробных препаратах (под ред. С.В. Яковлева, 2015). Однако за последние 10 лет на фармацевтический рынок было выведено всего лишь несколько новых антимикробных средств (Basseti M., 2013).

Предшествующие попытки разработать антибиотики на основе антимикробных пептидов либо потерпели неудачу в связи с быстрым разрушением пептидов ферментами, либо так и не были выпущены на фармацевтический рынок в связи с дороговизной производства (Grönberg, A., 2014; Teo S.W., 2017).

Спектр противомикробной активности дефензинов достаточно изучен (Pachón-Ibáñez M.E., 2017), однако не полностью исследован характер их бактерицидного действия на микроорганизмы, а также нет данных по их эффективности при совместном применении с бета-лактамами антибиотиками. Остается нерешенной проблема быстрой деградации дефензинов, что снижает их продолжительность действия.

Цель исследования.

Исследовать состав и антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных при синдроме диабетической стопы, разработать новые противомикробные лекарственные препараты для наружного применения на основе дефензинов.

Задачи исследования.

1. У больных с СДС исследовать состав микроорганизмов, выделенных из язвенно-некротических очагов.

2. Изучить чувствительность микроорганизмов при СДС к противомикробным препаратам.

3. Определить уровень антимикробных пептидов α -дефензина-1 (HNP-1) и β -дефензина-1 (hBD-1) в крови у больных с СДС до и после проведенного лечения.

4. Исследовать характер противомикробного действия дефензинов на клетки золотистого стафилококка с помощью методов компьютерного моделирования и атомно-силовой микроскопии.

5. Определить минимальные подавляющие концентрации дефензинов HNP-1 и hBD-1, а также их противомикробный эффект в комбинации с бета-лактамами антибиотиками в отношении клинических штаммов *S. aureus*, выделенных из диабетических язв.

6. Разработать лекарственные формы для наружного применения, содержащие HNP-1 и hBD-1, и исследовать их действие в модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс.

Научная новизна. Впервые за последние 10 лет исследованы локальные данные (г. Ставрополь) состава и антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных у пациентов с СДС. Необходимость изучения локальных и региональных данных определяется значительными отличиями в составе патогенов и их чувствительности к противомикробным препаратам в разных регионах и лечебных учреждениях (под ред. Страчунского, 2007; Козлов Р.С., 2010). По сравнению с локальными данными десятилетней давности (Батурин В.А., 2017), показано, что ведущим микроорганизмом при СДС по-прежнему является золотистый стафилококк, однако доля метициллин-резистентных штаммов увеличилась до 42,5%.

Впервые у пациентов с СДС исследованы уровни антимикробных пептидов HNP-1 и hBD-1 в крови до и после проведенного лечения. Установлено, что уровень дефензинов при СДС недостаточно высок для обеспечения адекватного иммунного ответа.

Впервые с помощью методов компьютерной химии показана возможность взаимодействия дефензинов с пептидогликаном, что ведет к разрушению клеточной стенки. Исследован механизм бактерицидного действия дефензинов на золотистый стафилококк в сравнении с бета-лактамым антибиотиком цефотаксимом с помощью высокоразрешающей атомно-силовой микроскопии.

Впервые показана выраженная противомикробная активность HNP-1 и hBD-1 в отношении метициллин-резистентных клинических штаммов золотистого стафилококка.

Впервые в отношении клинических штаммов золотистого стафилококка исследована антимикробная активность дефензинов HNP-1 и hBD-1 при совместном применении с цефотаксимом.

Впервые были разработаны лекарственные препараты для наружного применения, содержащие дефензины HNP-1 и hBD-1, инкапсулированные в кремнийорганические наноконтейнеры.

Впервые была показана способность дефензинов HNP-1 и hBD-1, инкапсулированных в кремнийорганические наноконтейнеры, ускорять заживление ран, инфицированных золотистым стафилококком (в сравнении с нативным ниосомальным гелем и мазью «Левомеколь»).

Теоретическая и практическая значимость работы.

1. Результаты исследования состава и антибиотикочувствительности микроорганизмов демонстрируют риски недостаточной эффективности противомикробной терапии, что связано с высоким уровнем резистентности микрофлоры, выделяемой у пациентов с СДС.
2. Определение концентраций дефензинов HNP-1 и hBD-1 в крови продемонстрировало роль данных пептидов в противoinфекционной защите при СДС, а также целесообразность дополнительного локального применения данных антимикробных пептидов.
3. Исследован механизм бактерицидного действия дефензинов путем взаимодействия с пептидогликаном.
4. Экспериментальные данные, полученные в ходе исследования комбинированного противомикробного действия дефензинов с цефотаксимом, позволяют предположить, что для увеличения эффективности бета-лактамовых антибиотиков возможно их совместное применение с дефензинами HNP-1 и hBD-1.
5. Результаты доклинического исследования разработанных ниосомальных гелей для наружного применения на основе дефензинов HNP-1 и hBD-1 в экспериментальной модели инфицированной раны позволяют рекомендовать продолжить исследования по внедрению в клиническую практику полученных препаратов для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний кожи, в том числе и СДС.

Методология и методы исследования. В соответствии с поставленными задачами выполнение научной работы состояло из двух этапов – эпидемиологического и экспериментального исследований.

Компьютерное моделирование выполнялось с применением современного программного обеспечения (HyperChem v.8, Auto Dock v.4). Атомно-силовая микроскопия проводилась по общепринятой методике пробоподготовки (И. В. Яминский, 1997) с использованием микроскопа NTegra Life (NT-MDT, Россия) с программным обеспечением Nova Px 3.4.

Микробиологические исследования (идентификация микроорганизмов, определение антибиотикочувствительности, исследование минимальных подавляющих концентраций, эксперименты с совместным использованием антимикробных пептидов и цефотаксима с целью изучения эффектов антагонизма и синергизма) были выполнены в соответствии с указаниями МУК 4.2.1890-04 и стандартами Европейского комитета по определению антимикробной чувствительности (Семин Н.А., 2004; Зубков М.Н., 2004; Matuschek E., 2014).

Все эксперименты на животных были выполнены в соответствии с принципами Женевской конвенции 1985 года о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларацией 2000 года о гуманном отношении к животным, а также одобрены Этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (протокол заседания Этического комитета №52 от 16.12.2015). Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в соответствии с правилами научных исследований с определением нормальности распределения и применением параметрических и непараметрических статистических критериев в программном обеспечении MaxStat Pro 3.6.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При синдроме диабетической стопы у пациентов, находящихся на стационарном лечении, в составе раневой микрофлоры преобладают штаммы *Staphylococcus aureus*; доля метициллин-резистентных штаммов составляет 42,5%.
2. У пациентов с СДС уровень дефензинов HNP-1 и hBD-1 в крови снижается на фоне хирургического лечения и/или фармакотерапии.
3. Дефензин HNP-1 оказывает бактерицидное действие на клинические штаммы *S. aureus*, создавая линейные разрывы по всей длине микробных клеток.
4. Дефензины HNP-1 и hBD-1 *in vitro* обладают выраженной противомикробной активностью в отношении MSSA и MRSA. Противомикробное действие бета-лактамов антибиотиков (цефотаксима) усиливается при их совместном применении с дефензинами в отношении MSSA.
5. Гели с инкапсулированными в кремнийорганические наноконтейнеры HNP-1 и hBD-1 являются перспективными для дальнейших доклинических исследований в качестве новых противомикробных и ранозаживляющих препаратов для наружного применения.

Внедрение результатов исследования. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования внедрены в клиническую практику городских клинических больниц №2 и №3 г. Ставрополя: оптимизирована эмпирическая антибиотикотерапия у госпитализированных пациентов с инфекциями кожи и мягких тканей (в том числе с синдромом диабетической стопы) в соответствии с полученными данными по составу и чувствительности микрофлоры к противомикробным препаратам. Кроме того, результаты работы внедрены в образовательный процесс кафедры клинической фармакологии с курсом ДПО Ставропольского государственного медицинского университета.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов, полученных в диссертационном исследовании, обеспечена использованием достаточного числа наблюдений, сравнений и контроля, использованием современных методов лабораторных и инструментальных исследований, а также методов статистической обработки данных.

Диссертационное исследование было выполнено в рамках реализации государственного задания (АААА-А19-119011890023-7 «Разработка ниосомального геля с антибактериальными пептидами для лечения инфекций при антибиотикорезистентности») и профинансировано Российским фондом фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-315-00081 («Исследование противомикробной активности антимикробных пептидов *in vitro* и *in vivo*»). Научно-исследовательская программа диссертационной работы отмечена стипендией Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

Результаты диссертационной работы апробированы на Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным болезням «ЕССМID 2017» (2017), XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2017), XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2018), V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (2018), IV международной научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (2018).

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 – в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, а также получен 1 патент на изобретение.

Структура и объем работы. Материалы диссертационного исследования изложены на 147 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список

использованной литературы включает 207 источников: 38 отечественных и 169 зарубежных. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 13 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор актуальной литературы, касающейся темы диссертационного исследования. Проанализирована проблема повсеместно распространяющейся антибиотикорезистентности и причины ее формирования, а также дана оценка основным микроорганизмам, представляющим наибольшую угрозу. Обобщены имеющиеся данные об антимикробных пептидах, в частности о дефензинах человека HNP-1 и hBD-1. Представлены их биологические свойства и возможности практического применения. Кроме того, в качестве примера нарастающей резистентности микроорганизмов обобщены литературные данные по синдрому диабетической стопы (СДС) и возможной роли в данном патологическом процессе антимикробных пептидов.

Во второй главе описаны материалы и методы диссертационного исследования. Общая схема диссертационного исследования приведена на рисунке 1.

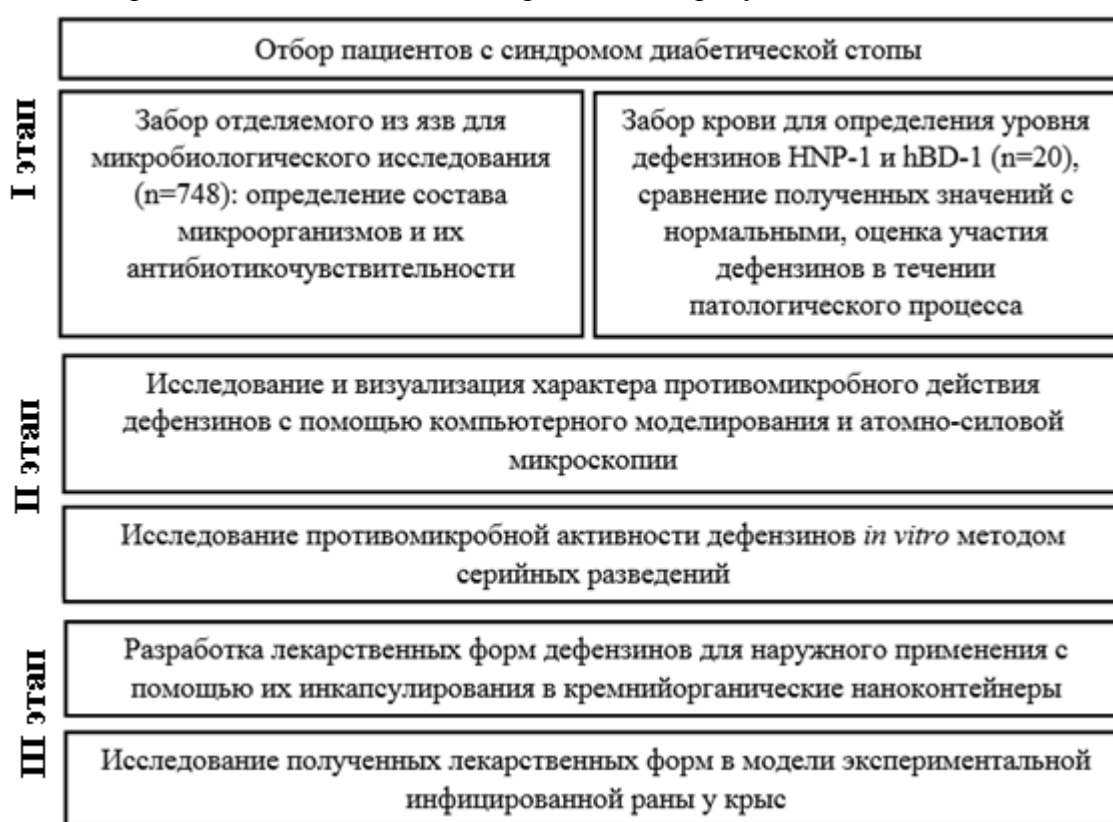


Рисунок 1. Общая схема диссертационного исследования.

Работа проводилась на базе Ставропольского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, хирургического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ставропольского края «Городская клиническая больница №3» г. Ставрополя, ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» (г. Ставрополь), НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика» центра биотехнологического инжиниринга Северо-Кавказского федерального университета (г. Ставрополь).

На первом этапе пациенты с СДС были обследованы с целью идентификации микроорганизмов, выделенных из диабетических язв, а также определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Всего было обследовано 748 пациентов, госпитализированных в стационар в период с 2015 по 2018 год с диагнозом: «Сахарный диабет 2 типа. Синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма». Выделение микрофлоры из раневого отделяемого проводилось до назначения антибактериальной терапии. Идентификация

микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным средствам проводились в лаборатории клинической микробиологии ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 и стандартами EUCAST (Европейский комитет по определению антимикробной чувствительности) (Семин Н.А., 2004; Зубков М.Н., 2004; Matuschek E., 2014).

Случайным образом было выбрано 20 пациентов с СДС, у которых были исследованы концентрации α - и β -дефензинов-1 (HNP-1 и hBD-1) в крови до начала лечения (до назначения антимикробных препаратов и проведения хирургического лечения) и после проведенного лечения – иммуноферментный анализ проводился с помощью наборов «ELISA Kit for Defensin Alpha 1» и «ELISA Kit for Defensin Beta 1» (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя в иммунологической лаборатории ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии».

В ходе экспериментальной части работы использовались следующие антибактериальные препараты: цефотаксим – порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного применения 1000 мг (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь), данный препарат (наряду с другими цефалоспоридами третьего поколения) показан в качестве эмпирической противомикробной терапии СДС в стационаре (под ред. Страчунского, 2007; под ред. С.В. Яковлева, 2015); «Левомеколь» – мазь для наружного применения 100 г, содержащая метилурацил (диоксометилтетрагидропиримидин; 40 мг на 1 г; стимулятор репарации тканей) и противомикробный препарат хлорамфеникол (7,5 мг на 1 г) (ОАО «Нижфарм», Россия); в соответствии с инструкцией по медицинскому применению, показанная для лечения инфицированных ран и является одним из самых часто назначаемых препаратов для наружного применения в хирургической практике (Григорьян, А.Ю., 2015).

Основываясь на проведенном обзоре литературы, для экспериментов *in vitro* и *in vivo* были использованы антимикробные пептиды из группы дефензинов: рекомбинантный α -дефензин-1 (HNP-1) и рекомбинантный β -дефензин-1 (hBD-1) производства Cloud-Clone Corp., США.

Для исследования механизма действия антимикробных пептидов было проведено компьютерное моделирование взаимодействия HNP-1 и пептидогликана (компонент клеточной стенки бактерий) методом молекулярного докинга (McConkey B.J., 2002) с использованием программного обеспечения HyperChem v.8 и Auto Dock v.4.

Для подтверждения данных, полученных методами компьютерной химии, представлялось интересным рассмотреть возможность визуализации процесса взаимодействия антимикробных пептидов с клеточной стенкой золотистого стафилококка – для этого была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ) (Binnig G., 1986; Миронов В.Л., 2004). Микроскопию образцов проводили с помощью АСМ NTegra Life (NT-MDT, г. Москва) в полуконтактном режиме. Была проведена морфометрическая оценка влияния цефотаксима (концентрация 32 мкг/мл) и HNP-1 (в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл) на клинические штаммы золотистого стафилококка. Бактерии инкубировались с антимикробными агентами в течение 5 и 20 мин в термостате при 37°C.

Изучение характера действия антимикробных пептидов, проведенное с помощью АСМ и компьютерного моделирования, определило необходимость исследования противомикробной активности дефензинов *in vitro*. В соответствии с международными микробиологическими стандартами и рекомендациями по изучению новых антимикробных препаратов, метод серийных разведений (или так называемый «метод шахматной доски») позволяет достоверно определять минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемого противомикробного агента, а также дает возможность оценивать «комбинированную» МПК двух антимикробных веществ при одновременном воздействии на микроорганизм (Orhan G., 2005; CLSI, 2015). Для исследования использовались выделенные от пациентов с СДС клинические штаммы *S. aureus*. Методом серийных разведений были изучены следующие комбинации антимикробных агентов: цефотаксим + HNP-1, цефотаксим + hBD-1 и HNP-1 +

hBD-1. За МПК бралось то значение концентрации противомикробного агента, при котором визуально полностью отсутствовал рост микроорганизмов (White R.L., 1996). Бактерицидный эффект комбинации двух веществ оценивался по величине индекса фракционной подавляющей концентрации (иФПК) (Ruden S., 2009).

Результаты, полученные в исследовании методом «шахматной доски», позволили подобрать несколько вариантов оптимальных концентраций дефензинов для приготовления лекарственных форм с целью изучения на животных. Так как нативные антимикробные пептиды в силу своей химической природы быстро разрушаются (Pachón-Ibáñez M.E., 2017), для увеличения продолжительности их действия, а также с целью улучшения их фармакологических свойств была использована технология инкапсулирования активных веществ в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы (Базиков, И.А., 2015).

Точная навеска 1 мг дефензина (HNP-1 или hBD-1) – из расчета 1 мкг в 1 мл фармацевтического геля, растворялась при перемешивании в воде для инъекций. В полученный раствор поэтапно добавлялось 100 мл ПЭГ-12 диметикона и 400 мл воды. Получение ниосом и инкапсулирование в них дефензинов (HNP-1 или hBD-1) проводилось при комнатной температуре и интенсивном механическом перемешивании на шейкере в течение 5-10 минут. Для формирования ниосом более мелких размеров смесь интенсивно перемешивалась с использованием гомогенизатора APV. Для формирования ниосом размерами 80-100 нм ранее полученная дисперсия ниосом с инкапсулированными дефензинами помещалась в сосуд для ультразвуковой обработки. Режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт; временные интервалы ультразвуковой обработки: 15, 30 и 45 минут. В результате повышается эффективность инкапсулирования дефензинов в ниосомы. Для того, чтобы физико-химические характеристики ниосом были постоянными, было использовано 50 мл гелеобразователя Covasyl MV 60 в жидком виде, который образует трехмерную объемную «сетку» при добавлении 20 мл триэтаноламина. Общий объем геля доводился до 1000 мл очищенной водой.

Таким образом, используя описанную методику, были получены два геля: ниосомальный HNP-1 (концентрация 1 мкг/мл) и ниосомальный hBD-1 (концентрация 1 мкг/мл). Ниосомальный HNP-1 с концентрацией 2 мкг/мл был получен аналогичным образом (при растворении 2 мг по вышеописанной методике). Кроме того, в качестве контроля был приготовлен нативный ниосомальный гель, не содержащий активных веществ.

Морфологические характеристики полученных ниосом оценивались с помощью сканирующего электронного микроскопа TESCAN Mira3 XMU (США).

Приготовленные ниосомальные гели были исследованы в модели экспериментальной инфицированной раны у крыс. Для моделирования экспериментальной раны были использованы лабораторные крысы линии Wistar (самцы, массой 180-200 г). Животным предварительно удалялась шерсть на месте предполагаемого нанесения дефекта (1 день эксперимента). Через сутки после удаления шерсти (2 день эксперимента) крысам при помощи инструмента для панч-биопсии (Medax EPT8000-00, Италия) была нанесена рана, в которую вносилось 1-2 мл бактериальной суспензии клинических штаммов *S. aureus* (MSSA, стандарт мутности 0,5 по МакФарланду), выделенных от пациентов с СДС.

Через сутки после инфицирования (3 день эксперимента) лабораторные крысы были случайным образом разделены на 5 групп (по 10 животных в каждой группе):

- 1 группа – контрольная – получали нативный ниосомальный гель без дефензинов;
- 2 группа – получали мазь «Левомеколь»;
- 3 группа – получали ниосомальный гель с HNP-1, 1 мкг/мл;
- 4 группа – получали ниосомальный гель с HNP-1, 2 мкг/мл;
- 5 группа – получали ниосомальный гель с hBD-1, 1 мкг/мл.

Антимикробные вещества наносились наружно один раз в сутки на пораженный участок начиная с 4 дня эксперимента – т. е. со вторых суток после нанесения ран и их инфицирования – до 15 дня эксперимента. Общая продолжительность лечения составила 12 суток. Площадь и периметр раны измерялись на 4, 9 и 16 день эксперимента. Для измерения площади и периметра ран использовалось программное обеспечение Wound Pro.

Для оценки заживления ран было использовано несколько методов:

1. Линейная скорость заживления ран (v , мм²/сут): $v=(2*(S_0-S_t))/(t*(P_0-P_t))$ (Осинцев Е.Ю., 1998), где P_0 и S_0 – периметр и площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; P_t и S_t – периметр и площадь раневой поверхности через промежуток времени t . В данном эксперименте с 4 по 9 день эксперимента $t=5$ суток, а с 9 по 16 день эксперимента – $t=7$ суток;

2. Относительная убыль площади ран (ΔS , %): $\Delta S= ((S_0-S_t)*100)/(S_0*t)$ (Аль Зубейди А.Ф., 2016), где S_0 – площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; S_t – площадь раневой поверхности через промежуток времени t . В данном случае, с 4 по 9 день эксперимента $t=5$ суток, а с 9 по 16 день эксперимента – $t=7$ суток;

3. Процентная скорость заживления ран (w , %): $w= (S_t-S_1)/(S_1*100)$ (Zhao Y., 2018), где S_1 – изначальная площадь раны (до начала лечения – на 4 день эксперимента), S_t – площадь раны через промежуток времени t – на 9 и 16 день эксперимента.

Использование трех различных способов оценки заживления ран было необходимо с целью максимальной объективизации в лучшей интерпретации полученных результатов, а также минимизации ошибок, т. к. каждая из представленных методик имеет свои преимущества и недостатки.

Вычисление относительной убыли площади ран является широко используемым методом оценки заживления поверхностных дефектов (Аль Зубейди А.Ф., 2016). Однако, при расчете данного показателя не учитывается периметр ран (раны с одинаковой площадью могут иметь разный периметр). Этот недостаток учтен при расчете линейной скорости заживления ран (Осинцев Е.Ю., 1998). С другой стороны, в зарубежной литературе общепринятым способом оценки регенерации поверхностных дефектов является величина процентной скорости заживления ран (Zhao Y., 2018). Данный показатель является и наиболее интуитивно понятным – чем ближе величина процентной регенерации ран к 100%, тем большая часть дефекта считается зажившей.

Для проведения статистического анализа полученных результатов использовалось программное обеспечение MaxStat Pro 3.6 (MaxStat Software, Германия).

В третьей главе представлены результаты исследования состава микроорганизмов и их антибиотикочувствительности у пациентов с СДС.

Состав микроорганизмов, выделенных из язвенно-некротических очагов при СДС

У 748 пациентов был выделен 851 штамм микроорганизмов, из которых грамотрицательные бактерии составили 312 штаммов – 36,7%, грамположительные – 516 штаммов – 60,6% и 23 штамма – грибы рода *Candida* – 2,7%. Рост отсутствовал у 223 пациентов – в 29,8% случаев.

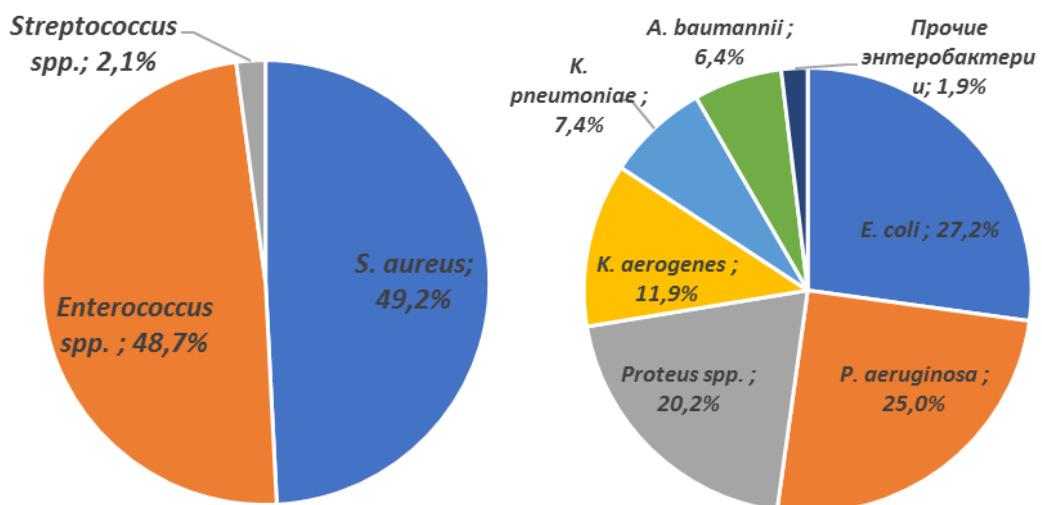


Рисунок 2. Состав грамположительных (слева) и грамотрицательных (справа) микроорганизмов, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Чувствительность микроорганизмов при СДС к противомикробным препаратам
(таблицы 1 и 2)

Таблица 1 – Антибиотикочувствительность грамположительных кокков, выделенных у пациентов с СДС

Препарат	<i>S. aureus</i> (n=254)	<i>E. faecalis</i> (n=251)
Ампициллин	н/о	94,4%
Оксациллин	57,5%	н/о
Цефоперазон	н/о	51,4%
Имипенем/меропенем	н/о	63,3%
Клиндамицин	67,7%	н/о
Амикацин	87,8%	н/о
Офлоксацин/левофлоксацин	66,9%	н/о
Ципрофлоксацин	56,3%	66,9%
Доксициклин	79,5%	51,4%
Хлорамфеникол	40,9%	43,8%
Ванкомицин	100%	100%
Рифампицин	91,7%	81,3%

Примечание: н/о – антибиотикочувствительность к данному препарату не была исследована.

Таблица 2 – Антибиотикочувствительность грамотрицательных бактерий, выделенных у пациентов с СДС

Препарат	<i>E. coli</i> (n=85)	<i>Proteus</i> <i>spp.</i> (n=63)	<i>K. aerogenes</i> (n=24)	<i>K. pneumoniae</i> (n=23)	<i>P. aeruginosa</i> (n=78)	<i>A. baumannii</i> (n=20)
Ампициллин	25,9%	9,5%	8,1%	н/о	н/о	н/о
Амоксициллин/ клавуланат	48,2%	31,7%	29,7%	н/о	н/о	н/о
Цефуросим	29,4%	9,5%	21,6%	н/о	н/о	н/о
Цефтазидим	40,0%	39,7%	43,2%	13,0%	43,6%	15,0%
Цефотаксим	36,5%	15,9%	37,8%	н/о	н/о	н/о
Цефоперазон	47,1%	52,4%	45,9%	13,0%	48,7%	25,0%
Цефепим	40,0%	25,4%	48,6%	8,7%	50,0%	25,0%
Цефоперазон/ сульбактам	96,5%	95,2%	97,3%	91,3%	98,7%	75,0%
Имипенем/ меропенем	56,5%	74,6%	54,1%	34,5%	62,8%	60,0%
Гентамицин	43,5%	46,0%	62,2%	17,4%	48,7%	75,0%
Амикацин	75,3%	57,1%	75,7%	56,5%	73,0%	85,0%
Ципрофлоксацин	48,2%	52,4%	59,5%	47,8%	52,6%	40,0%
Доксициклин	48,2%	85,7%	64,9%	65,2%	н/о	н/о

Примечание: н/о – антибиотикочувствительность к данному препарату не была исследована.

Таким образом, исследование микробиологического пейзажа при СДС показало, что в структуре раневой микрофлоры преобладают штаммы *S. aureus*, причем доля MSSA составляет 57,5%, а MRSA – 42,5%.

Госпитализированным больным с СДС показано применение системной антибиотикотерапии, которая должна назначаться с учетом локальных и региональных данных антибиотикорезистентности микроорганизмов. Лечение поверхностных открытых язв, без выраженных признаков воспаления подкожной клетчатки, может проводиться с помощью местных антимикробных препаратов и антисептиков (Uçkaу I, 2015).

В ходе проведенного исследования показан высокий уровень устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам. Очевидно, что требуется поиск новых безопасных и эффективных соединений, обладающих антимикробной активностью, с целью разработки новых подходов к фармакотерапии СДС.

При сахарном диабете уровень иммунологической реактивности снижен (за счет ослабления функции лейкоцитов, факторов врожденного иммунитета, ослабления фагоцитоза и бактерицидной активности фагоцитов), что увеличивает восприимчивость к инфекциям (Lebrun E, 2010). Следовательно, можно предположить, что низкая эффективность системной противомикробной терапии при СДС может быть связана не только с высоким уровнем антибиотикорезистентности, но и нарушениями иммунного ответа при сахарном диабете, а также нарушенной микроциркуляцией (что ухудшает проникновение системных антибиотиков в кожу и подкожно-жировую клетчатку). В этой связи представлялось интересным попытаться разработать противомикробные препараты для наружного применения на основе дефензинов с целью усиления эффективности системной антибиотикотерапии. Кроме того, учитывая, что данные пептиды продуцируются организмом для борьбы с инфекциями, важно исследовать их уровень в крови при СДС, с целью оценки их роли в данном патологическом процессе.

В четвертой главе приведены результаты исследования уровня дефензинов в крови у пациентов с СДС до проведения хирургического лечения и/или фармакотерапии и после проведенного лечения. Было показано, что концентрации дефензинов HNP-1 и hBD-1 в крови при СДС повышены при поступлении в стационар и достоверно снижаются после проведенного лечения, но не достигают значений у здоровых лиц (таблица 3).

Таблица 3 – Уровень дефензинов крови при СДС

Дефензин	До лечения (нг/мл)	После лечения (нг/мл)	Верхняя граница нормы у здоровых лиц (нг/мл)
α-дефензин-1 (HNP-1)	15 (11,1; 18,8)	10,9 (6,5; 12,4)*	3,54 (Cao W., 2016)
β-дефензин-1 (hBD-1)	42,4 (34,9; 62,8)	33,4 (20,5; 42,1)**	8,85 (Kaltsa G., 2016)

Примечание: результаты измерения дефензинов представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиль); * – $p=0,0022$, ** – $p=0,0035$ (в сравнении с уровнем дефензинов до начала лечения).

Таким образом, полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что HNP-1 и hBD-1 играют важную роль патогенезе сахарного диабета в целом и СДС в частности. Тот факт, что данные антимикробные пептиды повышаются в момент необходимости госпитализации (связанной, как правило, с ухудшением состояния больных и, вероятно, обострением патологического процесса), возможно говорит об их защитной противомикробной функции и участии в процессах заживления ран. Основываясь на полученных результатах, представлялось интересным исследовать возможность использования дефензинов HNP-1 и hBD-1 для разработки новых противомикробных препаратов для наружного применения с целью усиления эффективности системной антибиотикотерапии СДС.

В пятой главе представлены результаты исследований *in silico* и антистафилококковой активности дефензинов *in vitro* и *in vivo*.

Компьютерное моделирование взаимодействия HNP-1 и пептидогликана

По данным компьютерного моделирования при изучении молекулярных свойств докируемых молекул комплекса «HNP-1-пептидогликан» было показано, что сумма Епот. двух молекул будет равна -10711,7 ккал/моль (-7838,5 + (-2873,2)). Для образования устойчивого комплекса Епот. соединения должна быть ниже суммы энергий двух исходных компонентов. В данном случае потенциальная энергия комплекса равна достаточно высокому значению 549,3 ккал/моль. Это означает что соединение является нестойким и взаимодействие HNP-1 и пептидогликана может приводить к нарушению целостности клеточных стенок, либо к серьезным изменениям функциональных свойств исследуемого микроорганизма, что, вероятно, будет проявляться в виде продольно-поперечных линейных разрушений вдоль всего диаметра бактериальной клетки. Для проверки данной гипотезы была использована высокоразрешающая АСМ: был оценен характер противомикробного действия HNP-1 на клетки MSSA в сравнении с цефотаксимом.

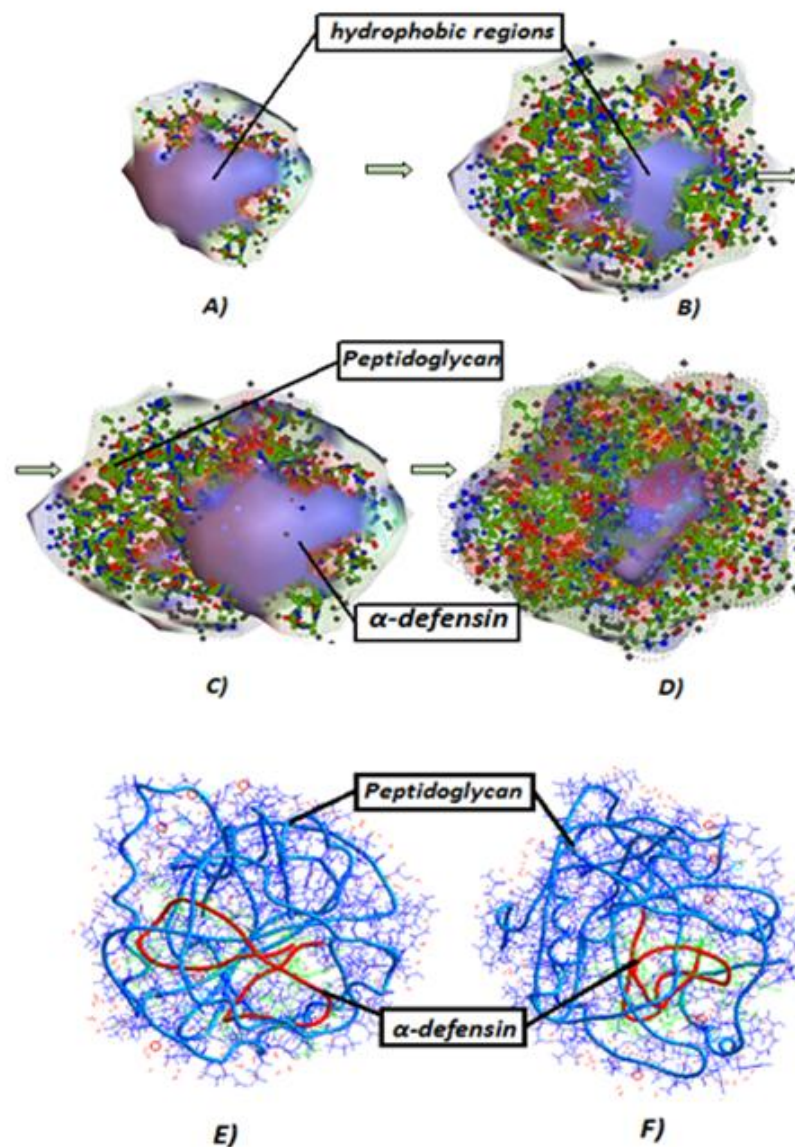


Рисунок 3. Этапы молекулярного докинга; А) молекула α -дефензина-1 (HNP-1); В) фрагмент молекулы пептидогликана; С) промежуточный этап докирования; D) комплексное соединение; E) структурная модель комплекса фрагмента пептидогликана с HNP-1 (фронтальная проекция); F) – она же, проекция сбоку.

Исследование влияния цефотаксима и HNP-1 на клетки S. aureus по данным атомно-силовой микроскопии

По данным АСМ морфология *S. aureus*, не подвергнутых действию HNP-1 или цефотаксима (контроль-1, время инкубации 5 минут при 37 °С) представлена на рисунке 4А. Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии данные свидетельствуют, что клетки золотистого стафилококка определяются, как кокковидные объекты сферической формы, напоминающие «гроздь винограда» на поверхности подложки.

При сканировании опытных образцов – *S. aureus*, подвергнутые действию цефотаксима (32 мкг/мл) в течение 5 и 20 минут – микроорганизмы определялись как объекты сферической формы, с наличием морфологически аномальных изменений на поверхности (рисунок 4Б). Воздействие антибактериального препарата приводило к уменьшению количества бактериальных клеток в поле сканирования. Кроме того, для золотистого стафилококка была определена и так называемая среднеквадратичная «шероховатость» (бугристость) (сокр. RMS, от англ. root mean square) поверхности бактериальных клеток (Petrik P., 2015). Уровень RMS в контрольных образцах составил 16,716 нм (время инкубации 5 мин при 37 °С) и 17,844 нм (время инкубации 20 мин при 37 °С). Уровень RMS в опытных образцах составил 30,803 нм и 39,401 нм (соответственно для 5 и 20 мин инкубации с цефотаксимом при 37 °С). Существенные отличия в величинах RMS между контрольными и опытными образцами, вероятно, объясняются действием цефотаксима, который подавляет синтеза пептидогликана, что приводит к последующим изменениям бугристости клеточной стенки.

АСМ бактерий, инкубированных с HNP-1 в течение 5 минут при 37 °С (HNP-1 2,5 и 5 мкг/мл), показала, что бактериальные клетки определялись как объекты сферической формы, с наличием морфологически выраженных повреждений на поверхности (рисунок 4В).

При инкубации золотистого стафилококка с α -дефензином-1 в течение 20 минут при 37 °С (HNP-1 – 2,5 и 5 мкг/мл) было показано, что повреждения клеточной стенки имеют более выраженный характер, чем при инкубации с HNP-1 в течение 5 мин и в поле сканирования почти не определялось целых клеток (рисунок 4Г).

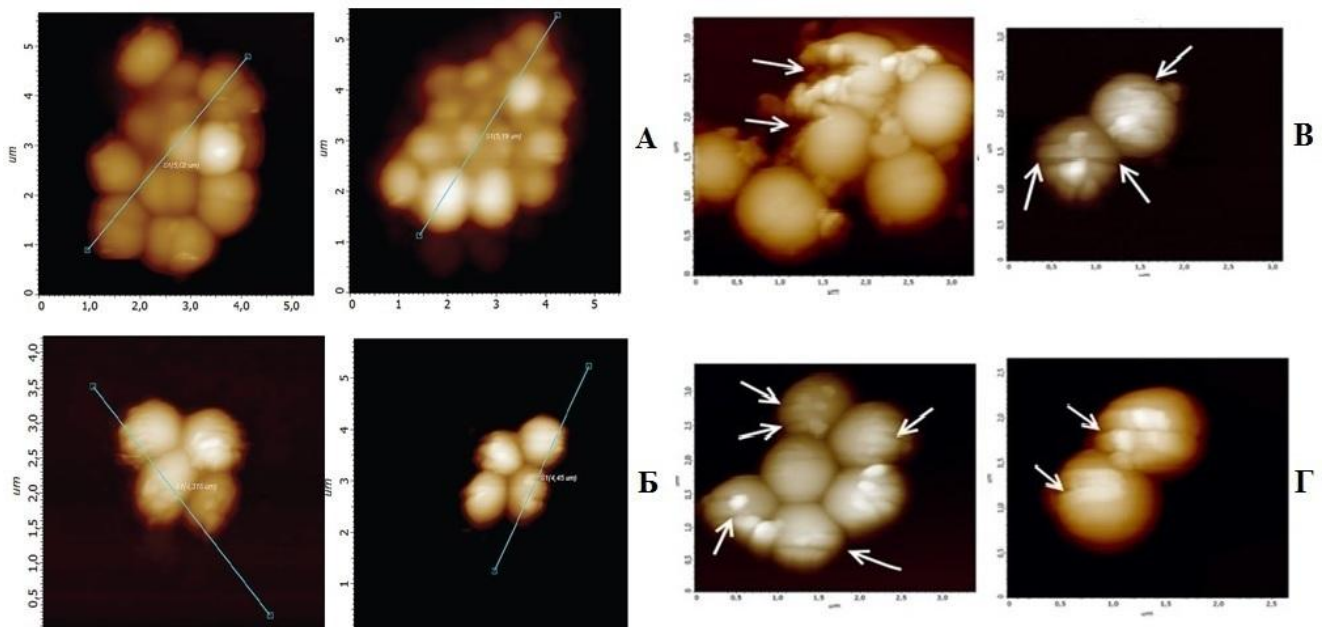


Рисунок 4. АСМ изображения *S. aureus*: А – без воздействия антимикробных агентов; Б – цефотаксим 32 мкг/мл; В – HNP-1 2,5 мкг/мл; Г – HNP-1 5 мкг/мл (в каждой паре изображений слева АСМ снимки через 5, справа через 20 мин инкубации при 37 °С).

Таким образом, было показано, что цефотаксим и дефензины оказывают разное действие на клетки золотистого стафилококка по данным АСМ: бета-лактамный антибиотик вызывает образование выбуханий на наружной поверхности клеточной стенки, что свидетельствует о несостоятельности бактериальной стенки и, вероятно, это вызвано ингибированием синтеза

пептидогликана. Антимикробный пептид создает линейные продольно-поперечные разрывы вдоль всего диаметра бактериальных клеток, что, по всей видимости, объясняется механизмом пермеабиллизации мембраны (Pachón-Ibáñez M.E., 2017).

Исследование антистафилококковой активности дефензинов in vitro

С целью разработки лекарственных препаратов, представлялось необходимым сначала исследовать антимикробный эффект дефензинов с помощью стандартного метода серийных разведений.

МПК HNP-1 в отношении MSSA и MRSA составила 1 мкг/мл. МПК β-дефензина-1 в отношении MSSA и MRSA также была идентична и составила 0,5 мкг/мл. Кроме того, методом серийных разведений была определена МПК цефотаксима в отношении MSSA – 2 мкг/мл.

Первая исследуемая комбинация была HNP-1 (диапазон концентраций от 0 до 5 мкг/мл) + цефотаксим (от 0 до 32 мкг/мл) – было показано, что сочетание данных антимикробных агентов позволяет снизить их «комбинированную» МПК – комбинация HNP-1 (0,5 мкг/мл) + цефотаксим (1 мкг/мл) приводила к подавлению роста MSSA.

Сочетанное использование hBD-1 и цефотаксима в отношении MSSA также приводило к усилению противомикробной активности данных агентов – 0,25 мкг/мл hBD-1 + 1 мкг/мл цефотаксима подавляли рост бактерий.

При воздействии комбинации двух дефензинов также удалось добиться взаимного усиления их антимикробного эффекта в отношении MSSA – рост отсутствовал при использовании комбинации 0,5 мкг/мл HNP-1 + 0,25 мкг/мл hBD-1.

Расчет иФПК показал, что совместное использование α-дефензина-1 и цефотаксима в отношении MSSA приводит к аддитивному складыванию антимикробного эффекта данных веществ. Такая же закономерность была выявлена при сочетанном применении против MSSA β-дефензина-1 и цефотаксима, а также при комбинации HNP-1 и hBD-1.

иФПК в отношении MRSA при сочетанном применении α-дефензина-1 и β-дефензина-1 составил 1,5, что свидетельствует о том, что данные дефензины не влияют на противомикробную активность друг друга.

Расчитать иФПК для комбинаций HNP-1 + цефотаксим и hBD-1 + цефотаксим в отношении MRSA невозможно, так как МПК цефотаксима в отношении данного штамма стафилококка невозможно определить ввиду резистентности.

Таким образом, было показано, что изученные антимикробные пептиды обладают выраженной противомикробной активностью в отношении как метициллин-чувствительных (MSSA), так и метициллин-резистентных (MRSA) штаммов *S. aureus*, выделенных из раневого отделяемого у пациентов с СДС. Кроме того, полученные данные позволили подобрать оптимальные концентрации антимикробных пептидов HNP-1 и hBD-1 для их инкапсулирования в кремнийорганическое наноконтейнеры с целью создания лекарственных форм.

Исследование эффективности ниосомальных дефензинов в модели экспериментальной инфицированной раны у крыс

С целью защиты от деградации пептидазами и увеличения продолжительности действия дефензины были инкапсулированы в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы). По данным электронной микроскопии размер полученных наночастиц составил $91,3 \pm 21,8$ нм. Лекарственные формы на основе HNP-1 и hBD-1 в виде ниосомальных гелей для наружного применения были исследованы в экспериментальной модели инфицированной золотистым стафилококком раны в сравнении с контрольной группой (нативный ниосомальный гель без дефензинов) и мазью «Левомеколь».

В 1 группе (контроль) средняя площадь ран на 4 день эксперимента составляла $5,4 \pm 1,1$ мм², на 9 день – $4,8 \pm 1,8$ мм², на 16 день – $4,0 \pm 1,9$ мм².

Во 2 группе («Левомеколь») средняя площадь ран на 4 день эксперимента составляла $6 \pm 0,7$ мм², на 9 день – $4,8 \pm 2,1$ мм², на 16 день – $1,5 \pm 1,1$ мм².

В 3 группе (ниосомальный HNP-1, 1 мкг/мл) средняя площадь ран на 4 день эксперимента составляла $5,4 \pm 1,2$ мм², на 9 день – $4,7 \pm 1,6$ мм², на 16 день – $3,9 \pm 1,7$ мм².

В 4 группе (ниосомальный HNP-1, 2 мкг/мл) средняя площадь ран на 4 день эксперимента составляла $5,8 \pm 1,7$ мм², на 9 день – $2,5 \pm 1,3$ мм², на 16 день – $0,6 \pm 1,4$ мм².

В 5 группе (ниосомальный hBD-1, 1 мкг/мл) средняя площадь ран на 4 день эксперимента составляла $6,7 \pm 1,3$ мм², на 9 день – $4,0 \pm 1,6$ мм², на 16 день – $1,3 \pm 1,3$ мм².

Очевидно, что во всех группах прослеживалась тенденция к заживлению ран. Для сравнения темпов заживления ран между группами были использованы такие показатели как линейная скорость заживления ран (v , мм²/сут), относительная убыль площади ран (ΔS , %) и процентная скорость заживления ран (w , %).

Рассчитанные величины линейной скорости заживления ран (таблица 4) имели нормальное распределение в соответствии с критерием Шапиро-Уилка. Полученные данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони (таблица 5).

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

Крыса	1 группа (контроль)		2 группа («Левомеколь»)		3 группа (HNP-1, 1 мкг/мл)		4 группа (HNP-1, 2 мкг/мл)		5 группа (hBD-1, 1 мкг/мл)	
	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}	v_9	v_{16}
1	-0,0085	0,0209	-0,0129	0,0350	-0,0080	0	0,0316	0,0220	0,0077	0,0214
2	0,0245	0	0,0145	0,0127	0,0143	0,0119	0,0232	0,0052	0,0214	0,0457
3	0,0267	-0,0077	0	0,0229	0	0,0000	0,0273	0,0381	0,0075	0,0549
4	-0,0073	0,0053	0,0222	0,0065	0	0,0085	0,0194	0,0139	0,0203	0,0056
5	0,0075	0,0133	0,0231	0,0079	0,0080	-0,0056	0,0267	0,0317	0,0067	0,0248
6	-0,0073	0,0049	0,0356	0,0357	0,0163	0,0073	0,0462	0,0357	0,0320	0,0077
7	0	0,0124	0,0082	0,0065	0,0078	0,0139	0,0390	0,0204	0,0218	0,0226
8	0,0255	0	0	0,0571	0,0091	0	0,0240	0,0451	0,0324	0,0220
9	0,0060	0,0045	-0,0063	0,0444	0,0174	0,0075	0,0190	0,0317	0,0462	0,0000
10	-0,0138	-0,0044	0,0148	0,0245	-0,0068	0,0048	0,0160	0,0408	0,0119	0,0366

Результаты однофакторного дисперсионного анализа с коррекцией Бонферрони показали, что ниосомальный HNP-1 в концентрации 1 мкг/мл не увеличивал скорость заживления ран и не имел значимых отличий от контрольной группы. «Левомеколь» в первые 5 дней лечения также не имел достоверных отличий от контроля. Наибольшую эффективность из всех препаратов продемонстрировал ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл. Более того, по полученным данным HNP-1 (2 мкг/мл) в первые 5 дней лечения оказался единственным эффективным средством из всех испытанных препаратов – достоверные отличия были выявлены при сравнении со всеми группами (таблица 5).

В последующие 7 дней лечения (с 9 по 16 день эксперимента) было показано, что ниосомальные дефензины HNP-1 (2 мкг/мл) и hBD-1 (1 мкг/мл), а также «Левомеколь» одинаково эффективны по сравнению друг с другом и имеют достоверные отличия от контрольной группы и 3 группы (HNP-1, 1 мкг/мл) (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты сравнения линейной скорости заживления ран с 4 по 9 день эксперимента и с 9 по 16 день эксперимента с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони

Сравниваемые группы	Значения <i>p</i>	
	С 4 по 9 день	С 9 по 16 день
1 группа и 2 группа	4,2266	0,0133
1 группа и 3 группа	9,3293	9,8802
1 группа и 4 группа	0,0035	0,0027
1 группа и 5 группа	0,0911	0,0237
2 группа и 3 группа	4,7246	0,0127
2 группа и 4 группа	0,0379	6,0106
2 группа и 5 группа	0,6168	8,4271
3 группа и 4 группа	0,0046	0,0026
3 группа и 5 группа	0,1132	0,0227
4 группа и 5 группа	2,6151	4,7150

Вычисление величин относительной убыли площади ран (ΔS , %) и процентной скорости заживления ран (w , %) подтвердило результаты вычисления линейной скорости заживления ран: ниосомальный HNP-1 в концентрации 1 мкг/мл не влиял на заживление ран, инфицированных золотистым стафилококком. «Левомеколь» и ниосомальный β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл ускоряли заживление ран (в промежутке с 9 по 16 день эксперимента) и были одинаково эффективны. Из всех исследованных препаратов наибольшей эффективностью обладал ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл, который ускорял заживление ран уже в первые 5 дней лечения.

Из представленных способов вычисления регенерации ран наиболее приемлемым оказался показатель процентной скорости заживления ран – чем выше величина w , тем меньше площадь поверхностного дефекта – рисунки 5 и 6.

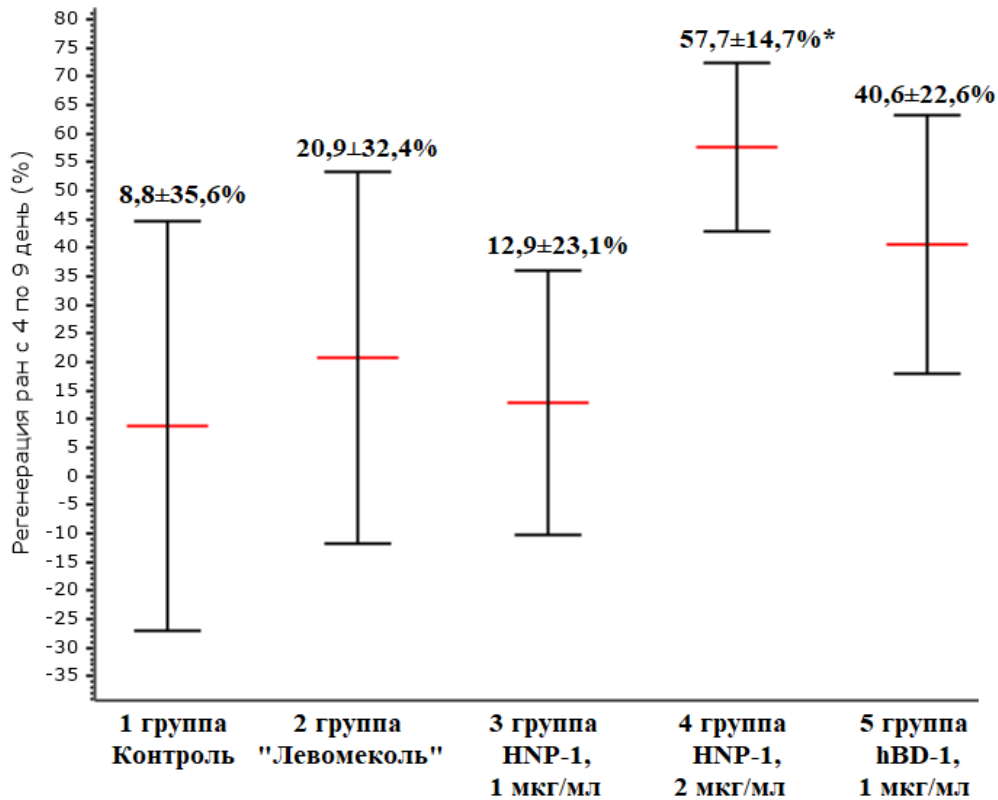


Рисунок 5. Процентная скорость заживления ран в первые 5 дней лечения. Красные линии – среднее арифметическое, черные линии – стандартное отклонение (\pm SD); * – достоверные отличия от контрольной группы при $p < 0,05$.

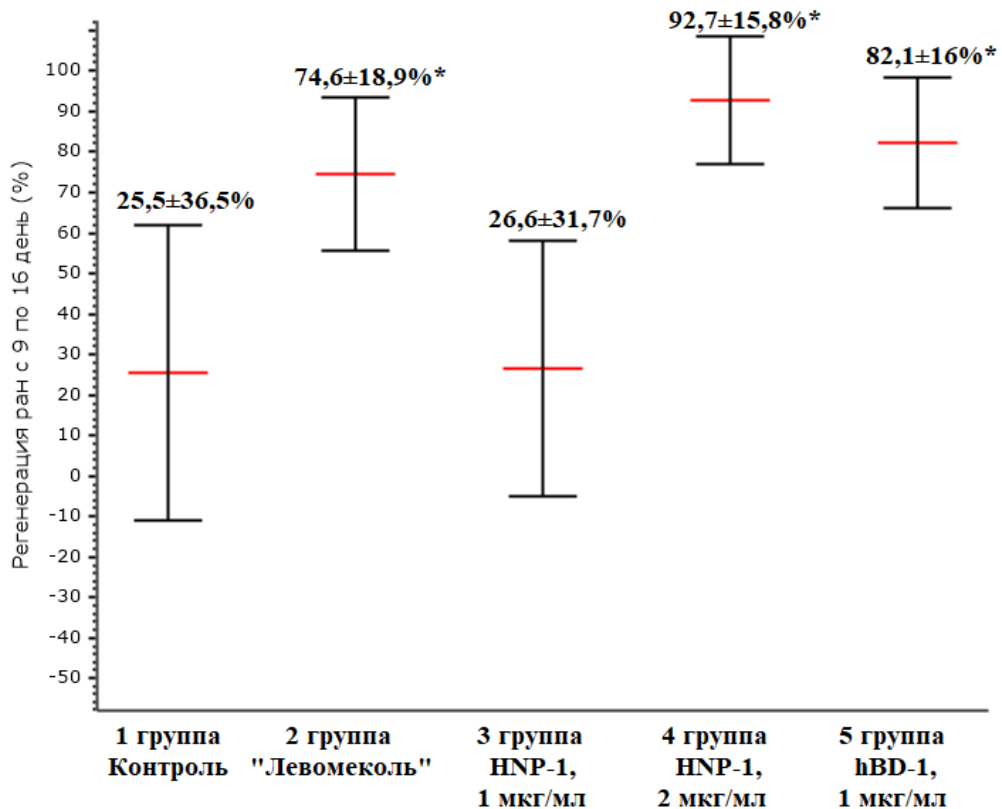


Рисунок 6. Процентная скорость заживления ран с 9 по 16 день эксперимента. Красные линии – среднее арифметическое, черные линии – стандартное отклонение (\pm SD); * – достоверные отличия от контрольной группы при $p < 0,05$.

В обсуждении полученных результатов полученные данные сравниваются с другими исследованиями по теме диссертационной работы. В ходе работы было установлено, что ведущим микроорганизмом, выделяемым при СДС, является *S. aureus*. Несколько реже выделялись штаммы энтерококка, энтеробактерий и синегнойной палочки. По сравнению с данными десятилетней давности (Батурин В.А., 2017) стали чаще выделяться *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.* и *A. baumannii*. Кроме того, за последние 10 лет у данной категории больных значительно снизилась чувствительность микроорганизмов к противомикробным средствам: доля MRSA увеличилась до 42,5%, заметно возросла резистентность микроорганизмов к цефалоспорином III-IV поколения и карбапенемам (Батурин В.А., 2017), что диктует необходимость поиска новых подходов к борьбе с антибиотикорезистентностью. Схожие тенденции определялись в исследованиях других отечественных и зарубежных авторов (Федосеев А.В., 2016; Абдурахманов А.К., 2018; Haldar J., 201; Ghotaslou R., 2018).

Большинство госпитализированных пациентов с СДС нуждаются в проведении системной антибиотикотерапии и использовании средств для наружного применения (под ред. И.И. Дедова, 2017). Однако из-за нарушенных иммунного ответа и микроциркуляции системные противомикробные препараты не позволяют добиться необходимой эффективности (Chantelau E., 1996; Dumville J.C., 2017), а средства для наружного применения не обеспечивают достаточный эффект ввиду высокой резистентности. Так, в ходе исследования было установлено, что чувствительность *S. aureus* к хлорамфениколу (входит в состав мази «Левомеколь») составляет всего 41%. Более того, еще одной причиной неэффективности фармакотерапии СДС может являться формирование биопленок (Høiby N., 2010), что играет немаловажную роль в персистенции инфекционных агентов в некротическом очаге.

В ходе работы было установлено, что при поступлении в стационар у пациентов с СДС уровни HNP-1 и hBD-1 в крови выше значений данных пептидов у здоровых лиц в 3-4 раза. После проведенного лечения уровень антимикробных пептидов в крови достоверно снижался, но не достигал нормальных значений – четырех-пятикратное превышение по сравнению со здоровыми лицами. Полученные результаты согласуются с данными других авторов (Rivas-Santiago B., 2012; Németh B.C., 2014).

Таким образом, повышенные уровни дефензинов у пациентов с СДС вероятнее всего являются факторами защиты от инфекции. Однако, по всей видимости, того количества вырабатываемых организмом дефензинов недостаточно для того, чтобы организм справился с гнойно-некротическим процессом. К примеру, при сепсисе уровень HNP-1 может повышаться до 170000 нг/мл (Panyutich A., 1993) – в четыре тысячи раз выше нормальных значений. По данным Батурина В. А. и Бошян Р. О. (Батурин В.А., 2019) было показано, что при локальных инфекционно-воспалительных процессах α - и β -дефензины могут демонстрировать 15-кратное повышение по сравнению с нормальными значениями. Очевидно, что при СДС уровень антимикробных пептидов HNP-1 и hBD-1 недостаточно высок для обеспечения адекватного клиренса патогенов из гнойно-некротических очагов.

В этой связи представлялось интересным исследовать возможность использования дефензинов HNP-1 и hBD-1 в качестве местных противомикробных лекарственных препаратов.

Для этого на первом этапе характер противомикробного действия дефензинов был исследован *in vitro* методами компьютерного моделирования (молекулярный докинг) и атомно-силовой микроскопии. Было показано, что дефензины обладают бактерицидным действием на клетки золотистого стафилококка, реализуя свой противомикробный эффект путем создания линейных разрывов по всему протяжению микробных клеток.

Кроме того, методом серийных разведений была изучена противомикробная активность дефензинов в отношении клинических штаммов MSSA и MRSA, выделенных от пациентов с СДС. Дефензины HNP-1 и hBD-1 продемонстрировали высокую активность в отношении данных штаммов стафилококка. Также было установлено, что при совместном применении HNP-1 или hBD-1 с бета-лактамами антибиотиками (цефотаксим) их антимикробный эффект аддитивно складывается. Остается непонятным, почему при использовании комбинации HNP-1 + hBD-1 против MSSA обеспечивается аддитивное складывание их противомикробного

действия, а в отношении MRSA данные дефензины никак не влияют на бактерицидную активность друг друга.

Полученные данные позволили разработать гели для наружного применения, содержащие в своем составе HNP-1 и hBD-1, инкапсулированные в кремнийорганические наноконтейнеры. Изготовленные ниосомальные гели были испытаны в модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс. Было показано, что гель, содержащий α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл (вдвое выше МПК) при использовании 1 раз в сутки ускоряет заживление ран уже в первые 5 дней лечения по сравнению с остальными исследованными препаратами. А гель, содержащий β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл (вдвое выше МПК) при использовании 1 раз в сутки ускоряет регенерацию ран у крыс в промежутке с 6 по 12 день лечения, что сопоставимо с действием мази «Левомеколь».

Эффективность исследованных препаратов на основе дефензинов обусловлена их выраженными антимикробными свойствами. Кроме того, многими авторами было показано, что HNP-1 и hBD-1 участвуют в процессах регенерации ран, васкулогенеза, активации и хемотаксиса иммунных клеток (Funderburg N., 2007; Grigat J., 2007; Presicce P., 2009; Rouré K.M., 2010; Kraemer B.F., 2011; Suarez-Carmona M., 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на клинической модели инфекции кожи и мягких тканей у госпитализированных пациентов с синдромом диабетической стопы были изучены состав микроорганизмов и их чувствительность к противомикробным средствам. Установлено, что ведущим выделяемым микроорганизмом при данном состоянии является *S. aureus* (28,5% среди всех выделенных штаммов), доля MRSA за последние 10 лет увеличилась на 10% и составила 42,5% (от общего количества штаммов золотистого стафилококка).

Очевидные риски снижения эффективности антибактериальных средств при СДС усугубляются недостаточным иммунным ответом. Несмотря на то, что уровень антимикробных пептидов – дефензинов у этих пациентов увеличивается, однако прирост их концентрации гораздо ниже, чем при других инфекционных процессах. Поэтому представлялось целесообразным попытаться увеличить содержание дефензинов в инфекционном очаге за счет их местного использования.

Перспективность такого подхода подтверждается результатами оценки бактерицидного действия антимикробных пептидов с помощью компьютерного моделирования и атомно-силовой микроскопии на клетки золотистого стафилококка. Дефензины вызывают массивное разрушение клеточной стенки золотистого стафилококка. Также было показано, что данные пептиды обладают выраженной антистафилококковой активностью в отношении MSSA и MRSA, а при совместном применении усиливают противомикробное действие цефотаксима на MSSA.

Для увеличения продолжительности действия дефензинов при наружном применении *in vivo* α -дефензин-1 и β -дефензин-1 были инкапсулированы в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы). Полученные препараты были исследованы в модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс. При этом ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл превосходил по эффективности традиционно используемый при раневой инфекции «Левомеколь», а также обеспечивал более быстрое разрешение инфекционного раневого процесса, чем ниосомальный гель с β -дефензином-1. «Левомеколь» и ниосомальный гель с β -дефензином-1 обладали аналогичной эффективностью.

Как показало исследование, дефензины в виде ниосомальной лекарственной формы можно рассматривать как перспективные средства для лечения инфекций кожи и мягких тканей.

ВЫВОДЫ

1. У госпитализированных пациентов с синдромом диабетической стопы чаще всего из гнойно-некротических очагов выделяются штаммы золотистого стафилококка (36,9% в монокультуре, 48% в микробных ассоциациях). Несколько реже выделяются *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa* и *Enterobacteriaceae spp.*, включая *K. pneumoniae* и *K. aerogenes*.

2. Доля метициллин-резистентных штаммов золотистого стафилококка (MRSA) составляет 42,5%. Отмечается низкий уровень чувствительности грамотрицательных бактерий к цефалоспорином и карбапенемам.

3. У пациентов с синдромом диабетической стопы уровень антимикробного пептида HNP-1 в крови достоверно снижается на фоне хирургического лечения и/или фармакотерапии: 15 (11,1; 18,8) нг/мл до лечения и 10,9 (6,5; 12,4) нг/мл – перед выпиской ($p=0,0022$), однако не достигает значений дефензинов у здоровых лиц. Аналогичная тенденция наблюдается и при исследовании уровня hBD-1: до лечения – 42,4 (34,9; 62,8) нг/мл и 33,4 (20,5; 42,1) нг/мл – после лечения ($p=0,0035$).

4. Один из механизмов бактерицидного действия дефензинов, вероятно, основан на взаимодействии с пептидогликаном. Дефензины приводят к гибели клеток золотистого стафилококка за счет создания линейных разрывов в клеточной стенке. Бета-лактамы вызывают изменения среднеквадратичной «шероховатости» клеточной стенки в виде выпячиваний на поверхности *S. aureus*.

5. Минимальная подавляющая концентрация α -дефензина-1 в отношении клинических штаммов MSSA и MRSA (выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы) одинакова и составляет 1 мкг/мл. Минимальная подавляющая концентрация β -дефензина-1 в отношении данных микроорганизмов составляет 0,5 мкг/мл. При совместном использовании дефензина (HNP-1 или hBD-1) с цефотаксимом против MSSA противомикробный эффект данных веществ аддитивно складывается. Аналогичная картина наблюдается при комбинации дефензинов между собой в отношении MSSA.

6. Наиболее эффективным из всех исследованных препаратов является ниосомальный гель, содержащий HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл, который ускоряет заживление инфицированных золотистым стафилококком ран у крыс в первые 5 дней лечения. Ниосомальный гель с hBD-1 (1 мкг/мл) и «Левомеколь» одинаково эффективны – ускоряют заживление инфицированных ран в промежутке с 6 по 12 день лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо осуществлять мониторинг состава и антибиотикорезистентности микрофлоры, выделяемой из гнойно-некротических очагов у пациентов с СДС. Эмпирическую антимикробную терапию СДС необходимо проводить с учетом локальных данных чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам.

2. Необходимо дальнейшее изучение роли антимикробных пептидов (дефензинов) при синдроме диабетической стопы.

3. Полученные результаты демонстрируют, что применение дефензинов HNP-1 и hBD-1 в качестве новых противомикробных и ранозаживляющих препаратов является перспективным. Необходимо дальнейшее исследование эффекта данных антимикробных пептидов в отношении других патогенов, а также представляется целесообразным оценить возможность применения дефензинов в качестве системных АБП. Кроме того, представляется интересным изучить эффективность полученных ниосомальных гелей не только у пациентов с СДС, но и при ожогах и трофических язвах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Батулин В.А., Селимов М.А., Болатчиев А.Д., Будкевич Р.О., Садовой В.В., Куницина Е.А. Исследование влияния цефотаксима на морфологические изменения клеток *Staphylococcus aureus* по данным атомно-силовой микроскопии // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 36-40.

2. Захарова И.Н., Климов Л.Я., Касьянова А.Н., Ягупова А.В., Курьянинова В.А., Долбня С.В., Батулин В.А., Бобрышев Д.В., Анисимов Г.С., Масальский С.С., Болатчиев А.Д. Роль

антимикробных пептидов и витамина D в формировании противoinфекционной защиты // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2017. – Т. 96, № 4. – С. 171-179.

3. Baturin V.A., Selimov M.A., Bolatchiev A.D., Sadovoy V.V., Budkevich R.O., Baturina M.V. The prognosis and investigation of α -defensin-1 (HNP-1) influence on morphological changes of *Staphylococcus aureus* cells by the atomic-force microscopy data // Medical news North Caucasus. – 2017. – V. 12, № 3. – p. 290-294.

4. Батурин В.А., Болатчиев А.Д., Зинченко О.В., Батурина М.В., Куницина Е.А. Изменение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным средствам у больных с синдромом диабетической стопы за последние 10 лет // Вестник современной клинической медицины. – 2017. – Т. 10, № 5. – С. 12-15.

5. Bolatchiev A.D., Baturin V.A., Bazikov I.A., Maltsev A.N. Effect of niosomal antimicrobial peptide hBD-1 on the healing rate of infected wounds in rats // Medical news North Caucasus. – 2018. – V. 13, № 3. – p. 515-517.

Работы, опубликованные в других изданиях

1. Болатчиев А.Д. Антимикробные пептиды - будущее антимикробной терапии // Материалы всероссийского молодёжного форума с международным участием. Тезисы докладов. – Ставрополь: СтГМУ, 2015. – С. 39-40.

2. Болатчиев А.Д., Батурин В.А. Дефензины. Роль в патологии человека и перспективы применения // Вестник молодого ученого. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 17-22.

3. Батурин В.А., Болатчиев А.Д., Зинченко О.В., Кобыляцкий Н.И., Куницина Е.А., Батурина М.В. Изменение антибиотикорезистентности микроорганизмов при синдроме диабетической стопы у пожилых больных // Актуальные вопросы современной медицины материалы X юбилейной межрегиональной научно-практической конференции. – Ставрополь: СтГМУ, 2017. – С. 99-101.

4. Vladimir Baturin, Albert Bolatchiev, Elena Kunicina, Nikita Kobylatsky, Maria Baturina, Zinchenko Oleg. How has antibiotic resistance changed over the past 10 years in patients with diabetic foot infection? // 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – Vienna, 2017. – p. 0731

5. Батурин В.А., Зинченко О.В., Болатчиев А.Д., Кобыляцкий Н.И., Демиденко И.Ф., Куницина Е.А. Формирование резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам при диабетической стопе // Сборник материалов XXIV национального конгресса «Человек и Лекарство». Тезисы докладов. – М.: Видокс, 2017. – С. 25.

6. Болатчиев А.Д., Базиков И.А., Мальцев А.Н., Седых О.И. Разработка ниосомального лекарственного геля с альфа-дефензином HNP-1 // Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы IV международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. – С. 17-18.

7. Болатчиев А.Д., Базиков И.А., Мальцев А.Н. Изучение эффективности ниосомального лекарственного геля с альфа-дефензином HNP-1 при лечении больных с диагнозом: сахарный диабет с синдромом диабетической стопы // Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы IV международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. – С. 19-20.

8. Болатчиев А.Д. Антимикробная активность дефензинов в отношении *Staphylococcus aureus* // Сборник материалов XXV национального конгресса «Человек и Лекарство». Тезисы докладов. – М.: Видокс, 2018. – С. 58.

9. Батурин В.А., Селимов М.А., Болатчиев А.Д., Садовой В.В. Сравнительная оценка влияния цефотаксима и α -дефензина-1 (HNP-1) на морфологические характеристики *Staphylococcus aureus* по данным атомно-силовой микроскопии // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т.81., приложение. – С. 25-26.

10. Bolatchiev A., Baturin V., Bazikov I., Maltsev A., Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP- 1 and hBD- 1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo* // Fundamental and Clinical Pharmacology. – 2019. (в печати).

Патенты на изобретение

1. Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв: пат. № 2655522 Российская федерация / Болатчиев А.Д., Батулин В.А., Базиков И.А. – 28.05.2018.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

иФПК – индекс фракционной подавляющей концентрации
МПК – минимальная подавляющая концентрация
СДС – синдром диабетической стопы
HNP-1 – α -дефензин-1 (нейтрофильный пептид человека 1)
hBD-1 – β -дефензин-1
MSSA – метициллин-чувствительные штаммы золотистого стафилококка
MRSA – метициллин-резистентные штаммы золотистого стафилококка
RMS – среднеквадратичная «шероховатость»