

*На правах рукописи*

**Хералова Наталья Ивановна**

**ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНОГО НИОСОМАЛЬНОГО ГЕЛЯ НА  
МИКРООРГАНИЗМЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИНФИЦИРОВАННОГО ОЖОГА  
РОГОВИЦЫ**

1.5.11. – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание учёной степени**

**кандидата медицинских наук**

Ставрополь – 2021

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:**

**Ильин Вячеслав Константинович** - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, отдел санитарно-гигиенической безопасности человека в искусственной среде обитания, заведующий

**Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий

**Ведущая организация:** 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 (ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера)

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 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 «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

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 (Каспарова Е.А. и соавт., 2010; Мороз О.В., 2014). 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. Играет роль также загрязнение окружающей среды, бесконтрольное применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Антибиотикорезистентные микроорганизмы часто становятся причиной возникновения инфекционного процесса (Kirkwood B. J. et al., 2007).

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 образование 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.

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. Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, являются важной задачей для 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 (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. В последнее время перспективными разработками являются исследования по использованию наноконтейнеров для адресной доставки (Dominici M. et al., 2006; Chen H.J. et al., 2009; Branch M.J. et al., 2012; Dhamodaran K. et al., 2015; Diskaeva E.I. et al., 2019). Данные о высокой клинической эффективности применения наносом кремнийорганической природы как наноконтейнеров (Базиков И.А. др., 2019) позволяют их позиционировать для доставки антимикробных комбинированных пептидов различной природы.

Тем не менее, используемые до настоящего времени методы лечения недостаточно эффективны (Шаимова В.А., 2006; Макаров П.В. и соавт., 2007; Околов И.Н. и соавт., 2009).

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 микрофлоры 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 эффективность ниосомальных гелей с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы.
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 эффективность 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.

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, ранозаживление 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 эффективность антимикробного ниосомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях, в том числе обусловленными антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Разработанный антимикробный гель продемонстрировал более высокую антимикробную активность, чем традиционно применяемый у пациентов с ожогами роговицы гель «Солкосерил».

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 (акты внедрения от 07.06.2021 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 антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы, технология выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов, разработка антимикробного 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).

## **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, поступившие в офтальмологическое отделение в возрасте от 19 до 70 лет, наличие информированного согласия на участие в исследовании. 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 менее чем за 4 недели до начала исследования; прием лекарственных препаратов менее, чем за 30 дней до начала исследования; участие пациента в других клинических исследованиях в течение месяца до включения в данное исследование; отказ от участия в исследовании. В исследование не были включены лица, принадлежащие к группам, участие которых в исследованиях запрещено (заключённые, военнослужащие, контингент интернатов для инвалидов).

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.

## **Микробиологические методы исследования**

Бактериологическое исследование слезной жидкости проводили сразу же после её сбора, в течение 3 часов. Посев слезной жидкости из конъюнктивальной полости осуществляли на следующие питательные среды: стафилококки выделяли на 2% желточно-

солевом и 5% кровяном агаре; 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).

Чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами и офтальмологическому гелю «Солкосерил» (Меда Фарма ГмбХ и Ко КГ (Германия)) определялась с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) на агаре Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с использованием стандартизированных дисков (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Для количественного определения выросших микроорганизмов применяли систему колониобразующих единиц – КОЕ/мл (CFU) и lg CFU.

### **Микроскопические методы исследования**

Изучение кремнийорганических ниосом проводилось на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия), подключенному к ПК, с использованием кремниевых кантлеверов NSG01 (NTMDT, Россия), напыленных золотом, для полуконтактной АСМ (резонансная частота кантилевера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5,5 Н/м) и CSG10 (NT-MDT, Россия) для контактной АСМ (резонансная частота кантилевера составляла 20 кГц, константа жесткости – 0,1 Н/м).

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) с подключением программного обеспечения Axio Imager (Carl Zeiss, Германия). Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). 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)). Для обработки изображений использовалась программа Nova (NT-MDT, Россия), позволяющая редактировать полученные изображения, а также представлять их в двух- (2D) и трехмерном (3D) формате.

### **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). Предварительно проводили вирусологический контроль крови. Определяли отсутствие антител к вирусам ВИЧ, гепатитов С и В с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест», р.п. Кольцово, Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Контролировался рН ( $6,81 \pm 0,23$ ), а также содержание аминного азота ( $249,90 \pm 36,35$ ) мг %. Затем в течение 1 часа 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 рН 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). Устанавливали длину волны 214 нм, позволяющую определить максимальную концентрацию антимикробных пептидов. Фосфатный буфер pH 7,4 выступал в роли подвижной фазы со скоростью подачи 150 мм<sup>3</sup> /мин. Калибровочную кривую выстраивали, применяя стандарт дефензина-альфа 1 компании Cloud-Clone Corporation (США).

#### **Иммунологические методы исследования**

Уровень 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 по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды (Базилов И.А. и соавт., 2019) и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры - кремнийорганические ниосомы (Болатчиев А.Д. и соавт., 2019). В дальнейшем получение ниосомальных гелей проводилось по оригинальной запатентованной нами 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 ниеосомального 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.

#### **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. Разработанный подход по выделению эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови позволяет получить ниеосомальный гель для лечения ожогов, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами.
3. Определение чувствительности выделенных стафилококков к разработанному ниеосомальному гелю с пептидами продемонстрировало его высокую антимикробную активность, значительно превышающую традиционно применяемые антибактериальные гели, что способствовало более раннему началу 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. Работа выполнена в соответствии с планом научных работ Ставропольского государственного медицинского университета по теме: «Разработка трансдермальных препаратов с использованием ниеосом - нановезикул кремнийорганической природы», номер государственной регистрации НИР: 01201372386.

Апробация диссертации проведена на совместном заседании коллективов кафедры микробиологии и кафедры офтальмологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольского государственного медицинского Университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 17 от 26.04.2021 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 120 страницах машинописного текста и иллюстрирована 14 рисунками и 11 таблицами. Диссертация состоит из введения, описания материалов и методов исследования, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающий 105 отечественных и 153 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 слезной жидкости больных с химическими ожогами выделено и идентифицировано 103 культуры микроорганизмов, изучены их основные биологические свойства. Результаты проведенных бактериологических исследований показали, что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной роговицей) имел следующий состав: коагулазоотрицательные стафилококки, в основном – *Staphylococcus epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.* - 14 (14%), коагулазоположительные стафилококки, в основном *Staphylococcus aureus* - 4 (4%), *E. coli* – 3 (3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Staphylococcus haemolyticus* - 3 (3%), *Streptococcus pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%) (Рисунок 1).

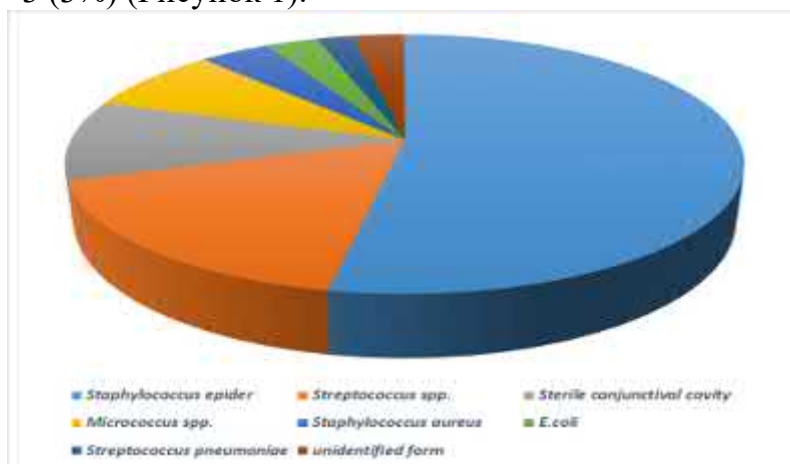


Рисунок 1 - Нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы

Таблица 1 - Структура частоты распространения этиологических факторов

Микроорганизмы	<i>S. epidermidis</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	<i>Sterile conjunctival cavity</i>	<i>Candida spp.</i>	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Unidentified form</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Контроль (n=100)	53	17	-	10	-	8	4	2		3	3	-
Опыт 1 (n=100)	53	8	10	7	13	-	2	-	4	-	-	3
Опыт 2 (n=100)	78	4	-	-	2	-	14	-	2	-	-	-

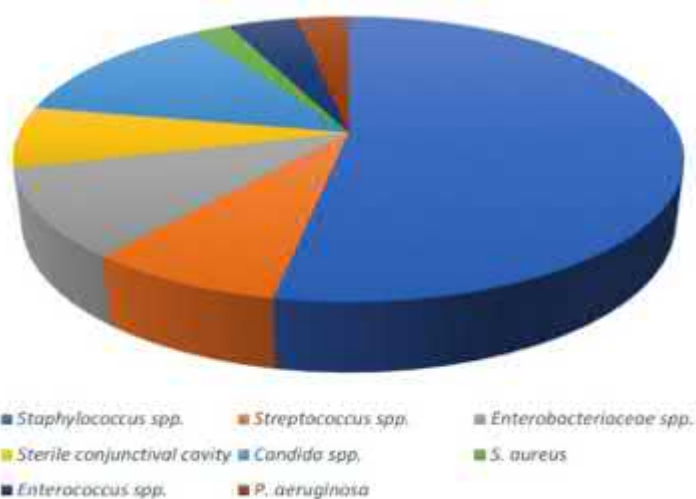


Рисунок 2 - Структура частоты распространения этиологических факторов.

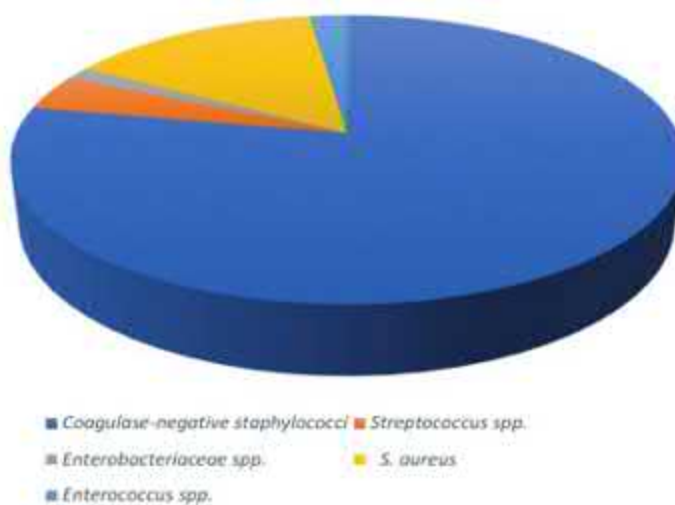


Рисунок 3 - Микробиоценоз конъюнктивной полости и роговицы у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов

Структура частоты распространения этиологических факторов инфекционного воспаления (Таблица 1, Рисунок 2) располагалась в следующем порядке: *Staphylococcus spp.* - 53%, *Streptococcus spp.* - 8%, *Enterobacteriaceae spp.* - 10%, *Sterile conjunctival cavity* – 7%, *Candida spp.* -13%, *S. aureus* – 2%, *Enterococcus spp.* - 4%, *P. aeruginosa* – 3%.

У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы патогенные штаммы стафилококков, как сопутствующая микрофлора, способствовали созданию благоприятной почвы для наложения кандидозной инфекции. При инфицированном химическом ожоге роговицы (Рисунок 3) было установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими патогенными микроорганизмами, как *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Dermatophytes spp.* Грамположительная флора встречалась в 98%, грамотрицательная - в 1,9% и грибы – в 0,1%. Среди грамположительных кокков: коагулазонегативные стафилококки: *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus pseudintermedius* - 76,2%; *S. aureus* – 14,1%; *Streptococcus spp.* – 3,9%; *Enterococcus spp.* – 2,1%; грамотрицательная микрофлора: *Enterobacteriaceae spp.* – 1,4%. Выделение грамотрицательной флоры колебалось от 1,4 до 2,1%. Она была представлена семействами *Enterobacteriaceae spp.*: *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii* и неферментирующими бактериями - *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

### **Получение антимикробного нисомального геля с пептидами**

Полученные нами по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды имели сигналы в диапазоне 2000 - 10500 Da (Рисунок 4). 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 5, Таблица 2). 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.

Выделенные низкомолекулярные плацентарные пептиды стандартизированы по антимикробной эффективности и регенераторной активности, что позволяет их использовать для иммунорегуляции, ранозаживления, нейротрофической терапии, и, безусловно, в лечении инфицированных ожогов роговицы.

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).

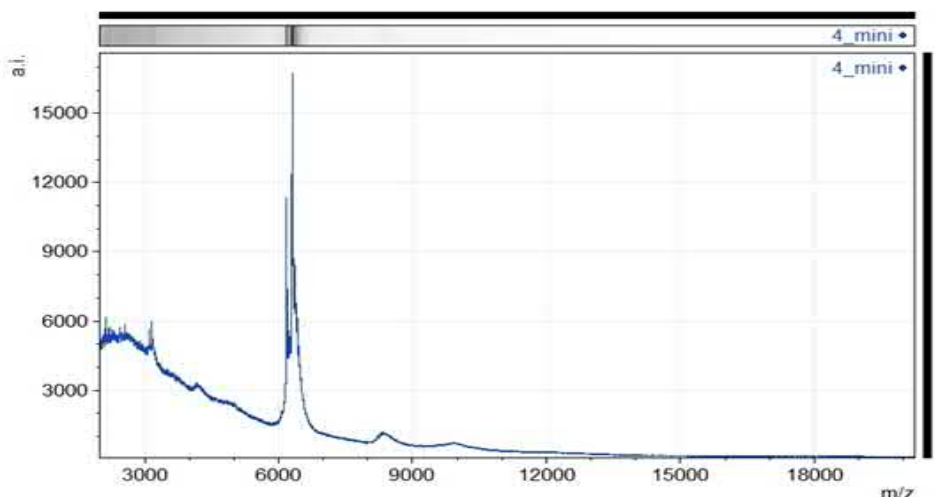


Рисунок 4 - Данные масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных плацентарных пептидов

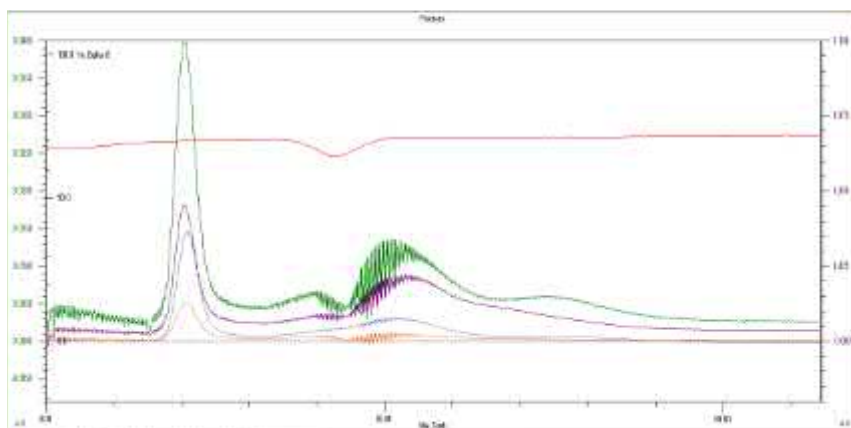


Рисунок 5 - Хроматограмма низкомолекулярных плацентарных пептидов

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

Таблица 2 - 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

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).

Выделенные из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы антимикробные эндогенные пептиды представляли собой дефензины-альфа. Калибровочный график концентраций

дефензин-альфа представлен на рисунке 6. Полученную фракцию еще раз стерилизовали фильтрацией через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 7 представлена хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки. Помимо дефензина альфа, выделены и другие виды дефензинов в остаточном количестве, отражённые в таблице 3, где пик 1-фракция дефензина альфа, а 2,3,4-фракции других дефензинов. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 8 представлена хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25. В таблице 4 отображены данные хроматограммы после промывки регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25.

Конструирование геля заключалось в иммобилизации выделенных низкомолекулярных плацентарных и антимикробных эндогенных пептидов в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы, обладающие доказанной высокой проникающей способностью.

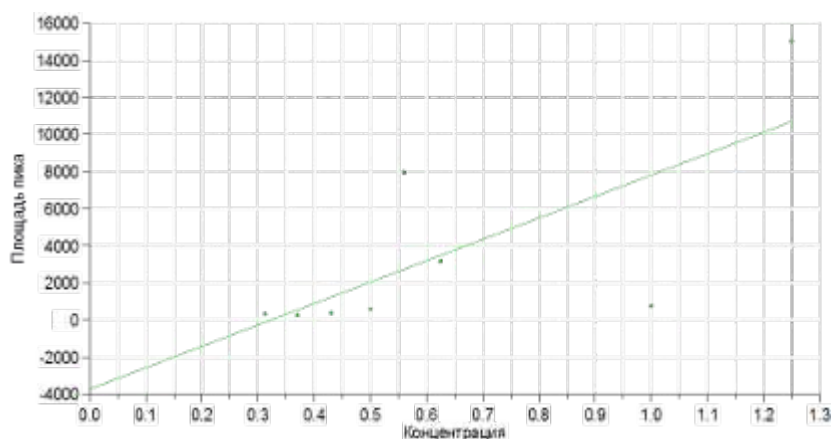


Рисунок 6 - Калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1)

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

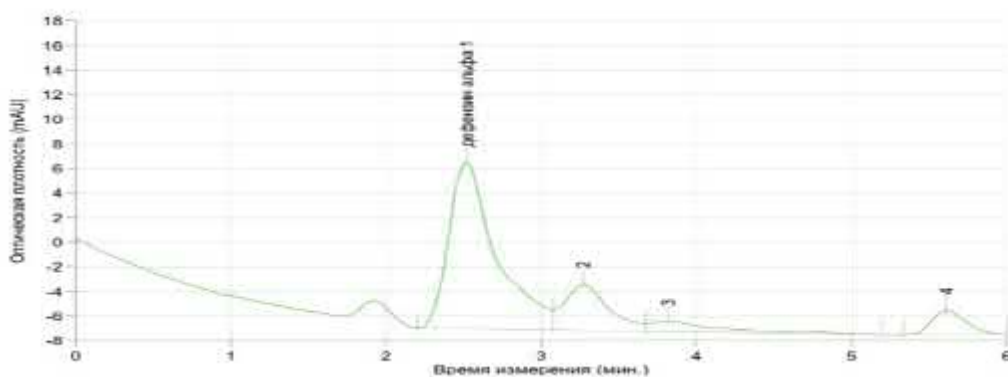


Рисунок 7 - Хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки

*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 3 - 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
4	5.61			1.976	30.067	14.199

Во внутренний объём ниосом инкапсулировали активную субстанцию – выделенные с помощью жидкостной хроматографии пептиды. Предварительно готовили точную навеску 100 г выделенных пептидов (в равном объёме эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных) из расчета 100 мг в 1 мл готового средства. Затем растворяли при перемешивании в 100 мл 70% пропиленгликоля и в полученный раствор добавляли 100 мл ПЭГ-12 диметикона. Пептиды, обладающие тропностью к ПЭГ-12 диметикону (липидной природы), иммобилизовались в ниосомы при длительном ультразвуковом воздействии.

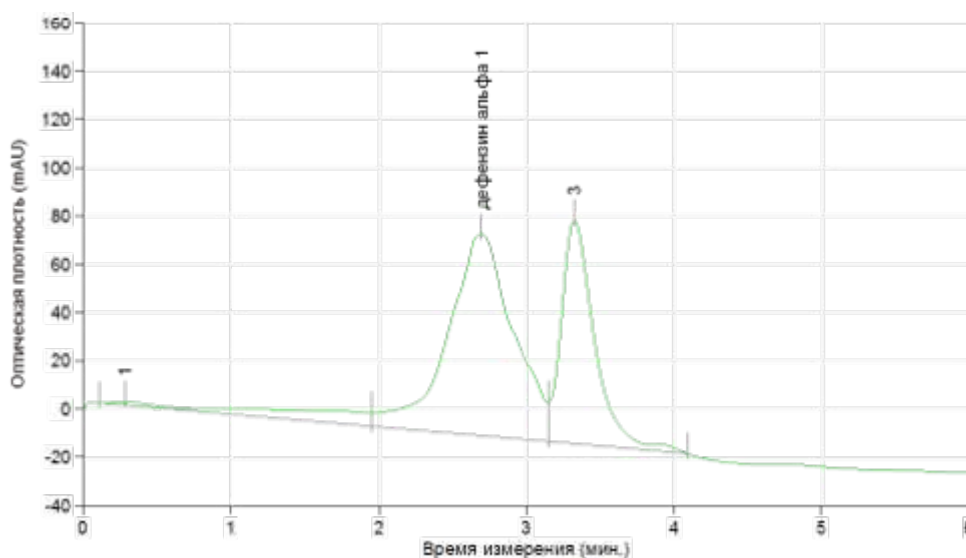


Рисунок 8 - Хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Таблица 4 - 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

Ультразвуковой метод получения ниосом использовали для иммобилизации выделенных пептидов следующим образом. В заключительной стадии эмульсию ниосом эмульгировали с очищенной водой до 1000 мл, содержащей 50 мл гелеобразователя и консервант Kathon CG 0,04-0,06 г. В ходе проведенных исследований по формированию эмульсий с содержанием низкомолекулярных пептидов 5, 10 и 15 масс%, экспериментальным путем установлено, что наибольшей стабильностью обладают композиции с 10 масс.% содержанием низкомолекулярных пептидов. Отработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами.

Полученные результаты показали, что оптимизированная технология выделения эндогенных низкомолекулярных пептидов перспективна для дальнейшего создания фармацевтических композиций.

### **Антимикробная эффективность ниосомальных гелей с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы**

Антимикробную эффективность разработанных ниосомальных гелей определяли с помощью диско-диффузионного метода (ДДМ). Чаще всего от пациентов с химическими ожогами роговицы выделяли *S.epidermidis*. Зона задержки роста этого микроорганизма в отношении ниосомального геля с пептидами находилась в пределах  $36,8 \pm 0,12$  мм. Используемые в качестве контроля свободные от геля, не пропитанные диски, не обладали антибактериальной активностью (Рисунок 9А). Чувствительность преобладающей выделенной микрофлоры выявляли к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами в концентрации 5%, 10% и 15% (опыт) и контролям. В качестве контролей применяли офтальмологический гель «Солкосерил» и свободные, не пропитанные диски (Рисунок 9Б). Выявлено, что антибактериальная эффективность 10% ниосомального геля с пептидами была в три раза больше, чем у геля «Солкосерил» (контроль) и составила  $42,1 \pm 0,18$  мм.

Зоны задержки роста *S.epidermidis* для геля «Солкосерил» составила  $14,8 \pm 0,12$  мм соответственно. Используемые в качестве контроля свободные от геля, не пропитанные диски, не обладали антибактериальной активностью.

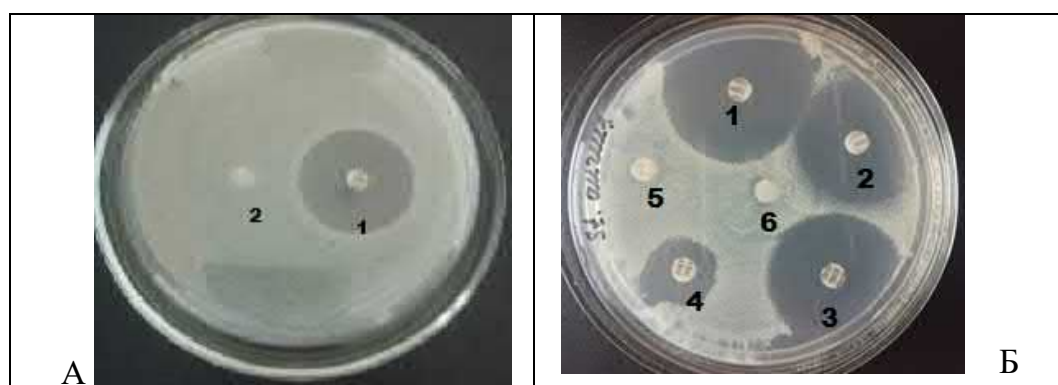


Рисунок 9 - Антибиотикочувствительность *S. epidermidis*

Примечание: А: 1-диск с 10% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 2- диск без геля (контроль); Б: 1-диск с 10% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 2-диск с 5% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 3-диск с 15% антимикробным ниосомальным гелем (опыт), 4- диск с гелем «Солкосерил» (контроль), 5, 6- диски без геля (контроль)



Таким образом, бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что разработанные гели с пептидами подавляют рост выделенных микроорганизмов со значительно превосходящей контроли эффективностью.

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

На экспериментальных животных проводили изучение безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными 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. Эти данные свидетельствовали об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

### **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-V 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  $48 \pm 9,3$  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 объяснялась тем, что наступало повреждение кератоцитов, являющихся их продуцентами.

### **Результаты гистологического исследования эффективности лечения ожогов в эксперименте при применении антимикробного ниосомального геля**

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> Мт/мл. Для заражения язвенной поверхности роговицы использовали 1 мл культуры. В первой контрольной группе животным проводили лечение офтальмологическим гелем «Солкосерил» 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 10А).

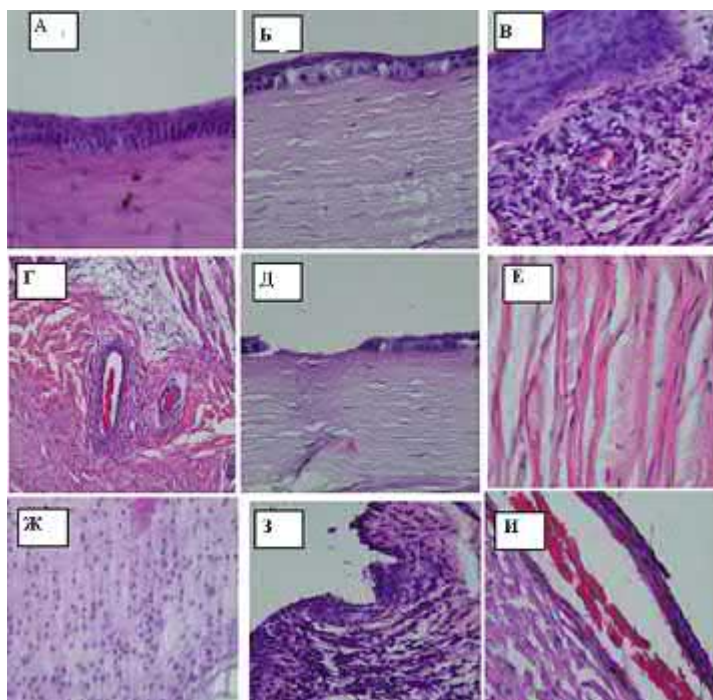


Рисунок 10 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога до лечения антимикробным ниосомальным гелем

*Примечание:* микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10x - 200x, окраска гематокси-лином и эозином

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 10Б). Между коллагеновыми волокнами появляются мелкоочаговые воспалительные инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов (Рисунок 10В). В краевой зоне роговицы наблюдается отек, полнокровие сосудов, стазы (Рисунок 10Г). На пятый день эксперимента эпителий роговицы характеризовался гидропической и баллонной дистрофией (Рисунок 10Д). В эти же сроки в собственной оболочке роговицы наблюдалось набухание эндотелия, сопровождающееся диффузным отёком (Рисунок 10Е). Воспалительная инфильтрация нарастала и сопровождалась преобладанием полиморфно-клеточных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов (Рисунок 10Ж).

Через 7 суток после химического ожога у интактных животных наблюдалось усиление дистрофических и деструктивных изменений (Рисунок 10З). За счёт отека происходило поднятие и отслоение многослойного плоского эпителия роговицы (Рисунок 10И). 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 способствовала 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 11А). На 5-е сутки лечения кератита антимикробным ниосомальным гелем патологические изменения в роговице были купированы

(Рисунок 11Б). Отмечалась полная регенерация эндотелия роговицы (Рисунок 11В). В данный период лечения отек собственной оболочки значительно уменьшился, отмечалось набухание коллагеновых волокон, но очаги деструкции не обнаружены (Рисунок 11Г).

На 7-е сутки лечения химического ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем в роговице глаза кролика наблюдалось врастание сосудов в роговицу при воспалительном процессе (Рисунок 11Д). Врастание 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 11Е). В опытной группе, в отличие от контрольной, к концу эксперимента отмечено восстановление прочных эпителиально-стромальных взаимоотношений.

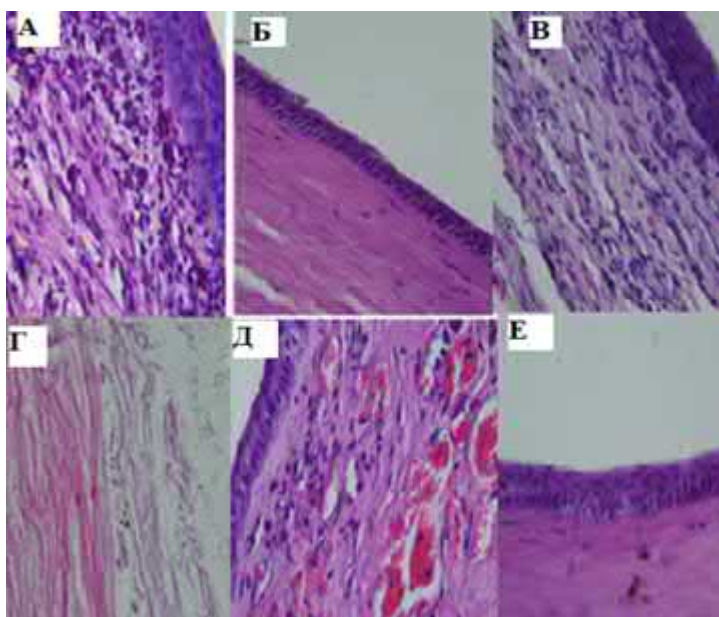


Рисунок 11 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога при лечении антимикробным ниосомальным гелем

*Примечание:* микроскоп Carl Zeiss Microscopy, GmbH; диапазон увеличений - 10x – 200x, окраска гематоксилином и эозином

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. Исследование конъюнктивы показало, что ток крови замедлялся, в мелких сосудах формировались тромбы, плазма выходила в окружающие ткани, что сопровождалось отеком конъюнктивы. Повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления. Применение офтальмологического геля «Солкосерил» ускоряло и стимулировало регенерацию

(восстановление) поврежденной роговицы и конъюнктивы при химическом ожоге по сравнению с интактными животными. Использование ниосомального геля стимулировало регенерацию роговицы эффективнее по сравнению с гелем «Солкосерил». 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. Проанализирован микробиоценоз конъюнктивы у пациентов с инфекционными осложнениями химических ожогов роговицы, который имел следующий видовой состав: *Staphylococcus epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.* - 14 (14%), коагулазоположительные стафилококки, в основном *Staphylococcus aureus* - 4 (4 %), *E.coli* – 3(3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Staphylococcus haemolyticus* -3 (3%), *Streptococcus pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%), что подтверждает ведущую роль представителей нормальной микрофлоры кожных и слизистых покровов в этиологии инфекционных осложнений при ожогах глаза.
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. Бактериологические исследования чувствительности выделенных стафилококков к ниосомальному гелю с пептидами продемонстрировали его антимикробную активность, превышающую в 2,8 раз традиционно применяемый антибактериальный гель «Солкосерил».
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.

Применение разработанного ниосомального антимикробного геля будет способствовать повышению клинической эффективности лечения пациентов с инфицированными ожогами роговицы, обусловленными антибиотикорезистентными микроорганизмами.

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 дефенинов, выделенных из клеток крови.

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. Калинин Н.И. // *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 наносом / 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 наносомального препарата «Регенерин» / И.А. Базиков, А.Н. Куличенко, Д.А. Ковалев, А.Н. Мальцев, **Н.И. Калинкина**, Е.А. Гоптарева, В.И. Королькова // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2017. - Т. 12, № 2. - С. 176-180.
7. Базиков, И.А. Оценка эффективности применения офтальмологического наносомального 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 наносомального 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 наносомального 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 наносомального геля при лечении ожогов, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами / **Н.И. Хералова**, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых, В.А. Батурин, 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 наносомальных 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
ВИЧ	— вирус иммунодефицита
г	— грамм
кг	— килограмм
кГц	— килогерц
ДДМ	— диско-диффузионный метод
ЖКТ	— желудочно-кишечный тракт
ИЛ	— интерлейкины
кДа	— килодальтон
мкМ	— микрометр
мл	— миллилитр
мл/мин	— миллилитр в минуту
НИР	— научно-исследовательская работа
нм	— нанометр
СтавНИПЧИ	— Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
СтГМУ	— Ставропольский государственный медицинский университет
ТД	— терапевтическая доза