

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕР-  
СИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

*На правах рукописи*

**Хералова Наталья Ивановна**

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

1.5.11. – микробиология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Базиков Игорь Александрович

Ставрополь - 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	7
Цель исследования.....	7
Задачи исследования.....	7
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	10
Материалы исследования.....	11
Пациенты.....	11
Животные.....	12
Материалы для микробиологических методов исследования .....	12
Микробиологические методы исследования.....	14
Диско-диффузионный метод для определения чувствительности тестируемых штаммов бактерий к дефензинам и антибиотикам.....	14
Метод микроразведений в бульоне .....	15
Микроскопические методы исследования .....	18
Хромато-масс-спектрометрические методы исследования .....	19
Иммунологические методы исследования .....	20
Биотехнологические методы исследования.....	20
Гистологические методы исследования.....	20
Клинические методы исследования .....	20
Статистические методы исследования.....	21
Личное участие автора в получении результатов.....	21
Основные положения, выносимые на защиту.....	22
Степень достоверности и апробация результатов.....	22
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	24

1.1. Распространенность микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам, и методы определения их чувствительности.....	24
1.2. Микробиота глаза в норме и при патологии.....	27
1.3. Биопленки при инфекциях глаз.....	34
1.4. Роль цитокинов в формировании защитных механизмов органа зрения.....	37
1.5. Механизмы повреждения роговицы при ожогах и современные методы лечения.....	41
1.6. Нанотехнологии для доставки антимикробных пептидов.....	44
1.7. Заключение.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
ГЛАВА 2. Исследования микрофлоры у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы.....	51
ГЛАВА 3. Разработка антимикробного ниосомального геля с пептидами.....	53
3.1. Технология получения антимикробного ниосомального геля с пептидами....	53
3.2. Оценка антимикробного действия дефензинов диско-диффузионным методом и методом микроразведений в бульоне .....	61
3.2.1 Диско-диффузионный метод.....	62
3.2.2 Метод микроразведений в бульоне - ММР.....	67
3.3. Изучение токсичности антимикробного ниосомального геля с пептидами....	73
ГЛАВА 4. Эффективность антимикробного ниосомального геля с пептидами у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы.....	75
4.1. Уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы.....	75
4.2. Результаты гистологического исследования эффективности лечения ожогов в эксперименте при применении антимикробного ниосомального геля.....	78
4.3. Изучение регенераторной способности антимикробного ниосомального геля с пептидами после инфицированного ожога в эксперименте.....	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
ВЫВОДЫ.....	98

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	99
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Согласно опубликованному 8 октября 2019 г. Всемирной организацией здравоохранения первому Всемирному докладу о проблемах зрения, более 1 миллиарда человек во всем мире живут с нарушениями зрения. По данным различных исследований, ожоги глаз составляют до 38% в общей структуре глазного травматизма [24]. 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 [37, 40]. Это наиболее серьёзные повреждения, как по характеру изменения в тканях, так и по исходу. При таких ожогах глаз 40-50 % пострадавших становятся инвалидами, а в 8-9% случаев это является причиной слепоты [23]. Слепота, вызванная патологией роговицы, находится на шестом месте в перечне основных причин нарушения зрения. 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 [56, 101, 102]. Играет роль также загрязнение окружающей среды, бесконтрольное применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Антибиотикорезистентные микроорганизмы часто становятся причиной возникновения инфекционного процесса [17, 20, 39, 69].

Снижение защитных механизмов гуморального и местного иммунитета также приводит к развитию инфекционных осложнений ожогов глаз, и как следствие этого - затруднению социальной адаптации пациентов работоспособного возраста, резкому снижению качества жизни пациентов [71]. Важным звеном гуморального иммунитета являются цитокины. Цитокины представляют собой группу белковых медиаторов, выполняющих регулирование защитной воспалительной реакции. 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. Разработка методик получения эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови человека и животных в современных условиях приобретает очевидную необходимость. В этой связи внимание исследователей привлечено к поиску возможностей разработки и изучения новых антимикробных средств с применением эндогенных антимикробных пептидов.

Один из перспективных методов лечения ожогов роговицы - использование плацентарных пептидов. Ранозаживляющая роль пептидов заключается в их мощном регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза, помимо этого известна высокая антимикробная активность экстракта клеток плаценты [67].

В тоже время активно развивается новое направление в совершенствовании местного лечения - разработка носителей лекарственных средств, применение которых позволяет обеспечить оптимальный процесс эпителизации раневой поверхности и повышение эффективности ранозаживления. Так, в практике была отмечена высокая эффективность восстановительного лечения слизистой оболочки полости рта стоматологическим наносомальным гелем, клиническая эффективность которого значительно превышает эффективность стандартных методов лечения [5, 8]. Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, являются важной задачей для клинической микробиологии и офтальмологии.

## **Степень разработанности темы исследования**

К настоящему времени, достижения медицины в области лечения инфицированных повреждений слизистой оболочки глаз связаны с использованием новых антимикробных и биологических модуляторов. К ним относятся низкомолекулярные пептиды с факторами роста и цитокинами (включая ингибиторы передачи сигналов и микро-РНК), генная терапия, стволовые клетки. Рядом учёных для стимуляции регенеративных процессов в роговице разработан гомологичный фибронектин и другие клеточные продукты [23, 140, 154, 158]. 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 [120, 127, 128, 138, 145, 146]. Данные о высокой клинической эффективности применения ниосом кремнийорганической природы как наноконтейнеров [5, 6, 7] позволяют их позиционировать для доставки антимикробных комбинированных пептидов различной природы.

Тем не менее, используемые до настоящего времени методы лечения недостаточно эффективны [59, 79, 101, 102].

Необходимость разработки новых методов борьбы с осложнениями химических ожогов послужила основанием для проведения данной работы.

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

### **Задачи исследования:**

1. Исследовать состав микробиоты у пациентов с инфекционными осложнениями химического ожога роговицы.
2. Разработать антимикробный ниосомальный гель на основе технологии выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных плацентарных пептидов и инкапсулирования их в кремнийорганические ниосомы.

3. Изучить антимикробную активность ниосомального геля с пептидами к микроорганизмам, выделенным у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы в диско-диффузионном методе и методе микроразведений.
4. Изучить безопасность антимикробного ниосомального геля с пептидами на экспериментальных животных.
5. Изучить уровень цитокинов и патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем с пептидами.
6. Оценить антимикробную и регенераторную активность ниосомального геля с пептидами при заживлении инфицированных ожогов в эксперименте.

### **Научная новизна**

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

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

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

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

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

Доклинические исследования безопасности разработанного антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами в диапазоне переносимых, токсических и летальных доз не приводило к гибели экспериментальных животных и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций, что свидетельствовало об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Дополнены современные представления о 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 активность антимикробного ниосомального геля на модели инфицированного ожога роговицы у экспериментальных животных позволяет рекомендовать его применение для лечения инфицированных ожогов роговицы в клинических условиях.

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

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

### **Методология и методы исследования**

Методологической основой настоящего исследования явился системный подход, в соответствии с поставленной целью и задачами, а также описанный в следующих работах: «О роли микробиоценоза роговицы в норме и при патологии» [13, 48, 52, 78]; «Об основных закономерностях адресной доставки при помощи ниосом» [6, 7, 8]; «О фундаментальных механизмах и сущности влияния бактериальных осложнений на химические ожоги роговицы» [69, 85, 252].

Комплексный анализ и системный подход применялся для выполнения экспериментов и изложения результатов. Для достижения поставленных задач были внедрены современные технологии. Доказательность выполненного исследования основывалось на проведении экспериментального апробирования и микробиологического сравнения, контролируемого рандомизированного исследования, а также

дедуктивного обобщения. Исследование включало выбор биологически активных действующих веществ, микробиологические и биотехнологические технологии, доклинические испытания токсичности на животных, инструментальные методы для определения иммунологических параметров, и гистологические методы изучения эффективности разработанных антимикробных средств.

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

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg). В работе использованы микробиологические, иммунологические, биотехнологические, клинические, экспериментальные, гистологические, а также статистические методы исследования.

## **Материалы исследования**

### **Пациенты**

Под наблюдением в офтальмологическом отделении СККБ 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 слёзную жидкость из конъюнктивальной полости пациентов.

### **Животные**

Исследование было выполнено на базе питомника Ставропольского государственного медицинского университета.

Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов породы «Шиншилла», весом 2,1–2,3 кг.

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

Проводили исследование микрофлоры конъюнктивальной полости пациентов, а также у экспериментальных животных при изучении антимикробной активности выделенных эндогенных дефензинов и разработанного ниосомального геля. Бактериологическое исследование слёзной жидкости проводили сразу же после её сбора, в течение 3 часов [3, 15, 63, 77, 79, 97]. Использовали стандарт мутности МакФарланда (производство BioSan, Россия) и диски с цефтаролином, Цефтаролин 5 мкг/диск (Bioanalyse, Турция). Посев слёзной жидкости из конъюнктивальной полости осуществляли на следующие питательные среды: Агар Мюллера-Хинтон (Agar Muller-Hinton, Becton Dickinson Difco, кат. № 225250, далее – МХА-Difco), ГРМ-агар Оболенск «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой» (Россия, Оболенск, «Лабораторные препараты»); стафилококки выделяли на 2% желточно-солевом и 5% кровяном агарах;

стрептококки на 5% кровяном агаре; дрожжеподобные грибы и грибы рода *Candida* на среде Сабуро; энтеробактерии на средах Эндо, Левина и Плоскирева (все среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили при оценке морфологических, культуральных и биохимических свойств. Использовали наборы стафи-, стрепто- и энтеротестов («ERBA LACHEMA», Чехия).

Проводили анализ чувствительности нормальной и выделенной у пациентов микрофлоры конъюнктивальной полости к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами и цефтаролину (Sigma Aldrich, Германия).

Для сравнительной оценки антимикробного действия выделенных дефензинов и цефтаролина при определении чувствительности к антимикробным агентам и МПК антимикробных агентов использовали грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы:

- контрольный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 (Американская коллекция типовых культур);
- контрольный штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Американская коллекция типовых культур).

Кроме контрольных штаммов для экспериментов по определению чувствительности к антимикробным агентам и МПК антимикробных агентов были выделены в бактериологической лаборатории штаммы *S. aureus* и *E. coli* (по 4 штамма) от здоровых людей и от больных с бактериальными осложнениями после химических ожогов роговицы,

*S. aureus* 1з – от здоровых людей;

*S. aureus* 2з – от здоровых людей;

*S. aureus* 1б – от больных людей;

*S. aureus* 2б – от больных людей;

*E. coli* 1з – от здоровых людей;

*E. coli* 2з – от здоровых людей;

*E. coli* 1б – от здоровых людей;

*E. coli* 2б – от здоровых людей.

## Микробиологические методы исследования

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

Для проведения диско-диффузионного метода диски пропитывали выделенными дефензинами. Навески лиофилизированных препаратов дефензинов (50 мкг) растворяли в 1 мл стерильной деионизированной воды. Стерильные «пустые» диски пропитывали данным раствором в объеме 0,1 мл на каждый диск, после чего диски просушивали при комнатной температуре. В результате конечная концентрация дефензинов в полученных дисках составляла 5 мкг/диск.

Перед началом работы культуру каждого микроорганизма инкубировали при температуре  $35 \pm 1$  °С, обычная атмосфера,  $18 \pm 2$  ч на ГРМ-агаре [9]. Бактериальную суспензию (инокулюм), используемую для посева тестируемого микроорганизма, готовили методом прямого суспендирования. Для этого стерильной бактериальной петлей с поверхности плотной неселективной питательной среды (ГРМ-агар) отбирали несколько колоний тестируемого микроорганизма, выросших при температуре  $(37 \pm 1)$  °С через  $(21 \pm 3)$  ч инкубации, и суспендировали в стерильном изотоническом растворе до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда путём визуального сравнения со стандартом мутности 0,5 по МакФарланду на белом фоне с черными линиями, что приблизительно соответствует нагрузке  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл (для *Escherichia coli*). Данный метод может быть использован для приготовления суспензий всех бактерий [9]. Также, в соответствии с Клиническими рекомендациями (2021), для проверки обеспечения питательной средой (агар Мюллера-Хинтон, Италия) надлежащего роста использовали контрольные микроорганизмы тех видов, для определения чувствительности которых она предназначена - *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 29213 [48].

Затем бактериальную суспензию в течение 15 мин после ее приготовления (но не позже 60 мин после приготовления) наносили на поверхность чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтон. Нанесение бактериальной суспензии проводили при помощи стерильного ватного тампона, предварительно погруженного в бактериальную суспензию. В соответствии с Клиническими рекомендациями

(2021), при работе с грамотрицательными бактериями (*E. coli*), чтобы избежать нанесения избыточного количества суспензии, тщательно отжимали тампон о внутренние стенки пробирки. При работе с грамположительными бактериями (*S. aureus*) не отжимали тампон о внутренние стенки пробирки [9]. Наносили бактериальную суспензию на всю поверхность агара штриховыми движениями в трех направлениях, добиваясь получения сплошного равномерного газона.

Не позднее 15 мин после посева на поверхность среды раскладывали диски с цефтаролином (5 мкг/диск) и дефензинами (5 мкг/диск), контролируя плотность и полноту контакта. Затем, не позднее 15 мин после нанесения дисков, чашки Петри с посевами помещали в термостат, не более 4-5 чашек в стопке. Культивирование *E. coli* и *S. aureus*, осуществляли при температуре  $(35\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(18\pm 2)$  ч.

После культивирования проводили учёт результатов, измеряя зоны полного подавления роста вокруг дисков с АМП и дефензинами с точностью до миллиметра при помощи линейки, по внутреннему диаметру роста единичных колоний. Для точного измерения чашку Петри помещали кверху дном с закрытой крышкой на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал под углом  $45^\circ$  (учет в отраженном свете). Учёт результатов проводили в соответствии с методологией EUCAST (вер. 2.0, 2011 г., [http://www.eucast.org/expert\\_rules/](http://www.eucast.org/expert_rules/)).

Для тест-штаммов микроорганизмов в целях контроля качества питательной среды (агара Мюллера-Хинтон, Италия) полученные значения диаметров зон подавления роста сравнивали с допустимым интервалом и целевым значением, находящимся в центре допустимого интервала, используя интерпретационные таблицы «Целевые и допустимые диапазоны значений минимальной подавляющей концентрации (МПК) и диаметров зон подавления роста контрольных штаммов, рекомендуемых для повседневного контроля качества» [9].

### **Метод микроразведений в бульоне**

Методы МПК используются при сравнительных испытаниях новых агентов, чтобы установить чувствительность микроорганизмов [4]. Для проведения данного этапа исследования МПК дефензинов и цефтаролина для клинических изолятов и

тест-штаммов *E.coli* и *Staphylococcus spp.* определяли с помощью метода эталонного ММР в бульоне [9].

Субстанции дефензинов и цефтаролин (Sigma Aldrich, Германия) в форме порошка использовали для определения МПК с помощью ММР.

Для приготовления стокового раствора навески дефензинов и антибиотика растворяли в деионизованной воде в концентрации 5120 мг/л; полученный раствор хранили при минус 25°С. Непосредственно перед исследованием в бульоне Мюллера-Хинтон готовили базовые растворы с концентрациями препаратов от 5120 мг/л до 1 мг/л, из которых затем готовили рабочие растворы дефензинов и АМП (концентрации 512-0,125 мг/л) в соответствии с ГОСТР ИСО 20776-1 – 2010 [4] – (Таблица 1).

Таблица 1 – Подготовка рабочих растворов антибактериальных агентов для использования в испытаниях чувствительности с применением разведений в бульоне

Концентрация антибактериального агента в базовом растворе (мг/л)	Объём базового раствора, мл	Объём бульона, мл	Полученная концентрация антимикробного агента, мг/л
5120	1	9	512
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0,5
1	1	3	0,25
1	1	7	0,125
1	1	14	0,06

Проводили подготовку планшетов для микроразведений в бульоне. Рабочие растворы (по 50 мкл) помещали в лунки 96-луночного планшета с удвоенной желательной окончательной концентрацией антимикробного агента. Последние

лунки в ряду, в которые помещали бульон без антибактериального агента, использовали для контроля бактериального роста – контроль 1. Аналогично, лунка, содержащая 100 мкл бульона (без антибактериального агента и без инокулюма), использовалась как неинокулированная лунка отрицательного контроля для каждого проверяемого штамма – контроль 2.

Предварительно осуществляли стандартизацию инокулюма – проверку чистоты культуры и подсчёт жизнеспособных колоний для каждого изолята. Для приготовления инокулюма использовали суточные культуры *E. coli* и *S. aureus*, выращенные при 37°C на агаре (ГРМ). Приготовленный инокулюм с оптической плотностью 0,5 по стандарту McFarland разводили бульоном Мюллера-Хинтон в соотношении 1:100 до концентрации  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл и вносили по 50 мкл в лунки планшета, содержащие 50 мкл рабочего раствора антимикробного агента. В результате окончательная концентрация бактериальных клеток составляла  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл, а рабочие концентрации цефтаролина и дефензинов находились в диапазоне от 0,06 до 4 мг/л.

Приготовленные планшеты запечатывали в пакеты из полиэтилена (предотвращение высушивания) и инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Результаты учитывали визуально при достаточном росте микроорганизма (явное пятно на дне лунки и помутнение бульона) в последних лунках в ряду (положительный контроль). Характер роста в тестируемых лунках сравнивали с характером роста в положительном контроле. Наиболее низкую концентрацию АМП, полностью подавляющую видимый рост бактерий, регистрировали как МПК. В качестве контроля использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 29213. Для лучшей визуализации результатов роста в некоторых случаях использовали фон с чередующимися черными и белыми полосками (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Учёт результатов определения чувствительности изучаемых штаммов бактерий с использованием фона с чередующимися черными и белыми полосами

*Примечание:* - нет роста микроорганизмов – четкая граница между черным и белым цветом (ячейка, обведена зеленым цветом);

- слабый рост (ячейки, обведенные оранжевым цветом);

- видимый рост (ячейки, обведенные красным цветом).

### **Микроскопические методы исследования**

Изучение кремнийорганических наносом проводилось на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия), подключенному к ПК, с использованием кремниевых кантилеров 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 дву- (2D) и трехмерном (3D) формате.

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

Эндогенные дефензины альфа выделяли по оригинальной методике из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и из плацентарной ткани эндогенные дефензины бета (Патент на изобретение №2729016 от 04.08.2020) [80]. Предварительно проводили вирусологический контроль крови и плацентарной ткани. Определяли отсутствие антител к вирусам ВИЧ, гепатитов С и В с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест») в соответствии с инструкцией изготовителя. Контролировался pH ( $6,81 \pm 0,23$ ), 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 pH 7,4. Осветляли полученный гидролизат добавляя 0,6 % перекись водорода. В дальнейшем проводили разделение компонентов на фракции с использованием хроматографической колонки с краном и фильтром (Симакс ЧСН ИСО 3585, Россия). Для гель-фильтрации на поверхность фильтра наносили 1,5 г Сефадекса G-25 с последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через бактерицидные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Выделяли фракцию с антибактериальными пептидами массой 3-5 кДа, пропуская через гель раствор фосфатного буфера pH 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия). Устанавливали длину волны 214 нм, позволяющую определить максимальную концентрацию антимикробных пептидов. Фосфатный буфер pH 7,4 выступал в роли подвижной фазы со скоростью подачи  $150 \text{ мм}^3 / \text{мин}$ . Калибровочную кривую выстраивали, применяя стандарт дефензина-альфа 1 компании Cloud-Clone Corporation (США) [10].

Для выделения более полной фракции эндогенных низкомолекулярных пептидов, содержащих дефензины-бета с широким комплексом антимикробных пептидов и повышенной биологической ценностью, использовали измельчённую

гомогенизированную ткань плаценты животного происхождения. Проводили трипсинизацию и выделение АМП методом жидкостной хроматографии на разделительной колонке с использованием Сефадекса G-25.

### **Иммунологические методы исследования**

Изучали уровень цитокинов у экспериментальных животных при инфицировании химических ожогов роговицы и лечении антимикробным ниосомальным гелем. Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF- $\alpha$  в слезной жидкости животных определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкции производителя.

### **Биотехнологические методы исследования**

Полученные ранее по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды [5, 62, 63] и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры - кремнийорганические ниосомы [8, 9, 10]. В дальнейшем получение ниосомальных гелей проводилось по оригинальной запатентованной нами технологии (Патент на изобретения РФ № 2655522) [80].

### **Гистологические методы исследования**

Гистологические исследования глаз животных проводили по общепринятым методикам. 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 ГБУЗ СК «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 нисомального 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 - в патоморфологической лаборатории СтГМУ с участием д.м.н., профессора Боташевой В.С. При написании диссертационной работы автором выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и

практических рекомендаций, активное участие в написании обзорных и оригинальных статей по теме диссертации.

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

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

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

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

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

Апробация диссертации проведена на совместном заседании коллективов кафедры микробиологии и кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО Ставропольского государственного медицинского Университета Министерства здравоохранения РФ (протокол кафедрального заседания № 11 от 30.05.2022 г).

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Распространенность микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам, и методы определения их чувствительности

Появление микроорганизмов, устойчивых к антимикробным препаратам (АМП), является существенной проблемой для здоровья людей во всем мире [121]. Если раньше имели место инфекции, обусловленные возбудителями, устойчивыми к одному-двум классам антибиотиков, то сейчас микроорганизмы проявляют устойчивость практически ко всем классам антибиотиков [132].

Ежегодно умирают около 50 000 больных, инфицированных микроорганизмами, устойчивыми к лекарственной терапии. Прогнозируется, что к 2050 г. это число возрастет до 10 миллионов смертей в год [27, 96, 118, 214].

Одной из составляющих проблемы резистентности к АМП является увеличение количества применяемых антибиотиков в сельском хозяйстве при лечении животных, для профилактики распространения инфекций, в качестве добавки в концентрированных кормах. Устойчивые к АМП микроорганизмы широко распространены в окружающей среде, так как контаминируют сельскохозяйственных животных и передаются людям через пищевые цепи. Сегодня свыше 63 000 тонн антибиотиков (в том числе и предназначенных для лечения людей) в год используются в сельском хозяйстве во всем мире, а по данным экспертов к 2030 г. прогнозируется увеличение до 105,6 тысяч тонн в год из-за роста численности населения и спроса на продукты аграрного сектора [21,191].

Для снижения распространения возбудителей, устойчивых к АМП, всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в 2015 г. разработала план действий по борьбе с резистентностью [118, 137, 164]. В этой связи с 2017 г. в России принята «Стратегия предупреждения и преодоления устойчивости микроорганизмов и вредных организмов растений к лекарственным препаратам, химическим и биологическим средствам на период до 2030 г. и дальнейшую перспективу». В этом документе обозначено пять направлений по созданию новых АМП; улучшению диагностики и

внедрение обязательных лабораторных исследований для выявления антибиотико-резистентности в медицинских учреждениях [27].

Список бактерий, резистентных к лекарственным средствам и представляющих наибольшую опасность жизни и здоровью людей впервые был опубликован в 2017 г. ВОЗ отметила, что для борьбы с ними крайне необходимы новые АМП [164].

В последние годы разработано всего несколько новых антибиотиков (теиксобактин, лефамулин, гепотидацин и др.). Остальные полученные лекарства являются аналогами уже существующих [187], к тому же большинство из них проявляют активность только против грамположительных бактерий. Из 37 новых антибиотиков, только несколько являлись активными против микроорганизмов, относящихся к группе ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители семейства *Enterobacteriaceae*). Эти бактерии чаще других демонстрируют устойчивость к АМП, являясь причиной большинства инфекций [187]. Поэтому чрезвычайную актуальность приобретает появление новых классов антибактериальных агентов.

Таким образом, устойчивость микроорганизмов – многогранная проблема, связанная с неправильным назначением АМП при ошибках в выполнении тестирования чувствительности, что приводит к неправильному выбору антибиотиков для лечения и способствует распространению резистентности [27].

Для лабораторного тестирования применяют фенотипические и молекулярно-биологические методы определения чувствительности микроорганизмов к АМП. В отличие от фенотипических методов, основанных на оценке влияния АМП на жизнеспособность микроорганизмов, молекулярно-генетические методы направлены на детекцию приобретённых генов резистентности и мутаций в геномах бактериальных возбудителей [157]. Однако для широкого применения на практике в бактериологических лабораториях актуальны такие фенотипические методы, как метод последовательных (серийных) разведений и диффузионные методы: диско-диффузионный метод и метод градиентной диффузии (метод E-тестов)

В методе последовательных (серийных) разведений определяют минимальные подавляющие концентрации (МПК). Полученные данные говорят о микробиологической активности АМП. В зависимости от используемой питательной среды существуют метод последовательных (серийных) разведений в агаре и в бульоне. Также играет значение объем жидкой питательной среды, подразделяя метод макро- и микроразведений [62, 105].

В нормативных документах по определению чувствительности микроорганизмов к АМП указаны пограничные значения интерпретационных таблиц, с которыми сопоставляют значения МПК, полученные методами последовательных (серийных) разведений и в результате определяют клиническую категорию чувствительности исследуемого возбудителя инфекции [31, 62].

Диско-диффузионный метод чаще всего применяется в бактериологических лабораториях [178]. Метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, не требует специального оборудования и является универсальным для АМП различных групп [213].

Способность АМП диффундировать из пропитанных бумажных дисков в плотную питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности среды является основным принципом этого метода.

Диско-диффузионный метод обладает высокой воспроизводимостью, прост в использовании, относительно дешёвый и доступен для любой бактериологической лаборатории [48]. Разновидностями классического диско-диффузионного метода являются метод комбинированных дисков, метод двойных дисков, метод инактивации карбапенемов (Carbapenem Inactivation Method – СИМ-тест), которые используются для более узкоцелевых исследований с целью выявления отдельных механизмов резистентности.

Метод градиентной диффузии (метод Е-тестов) предназначен для получения значений МПК антибиотиков. В этом методе используются стандартные пластиковые полоски, пропитанные АМП с экспоненциально убывающим градиентом концентрации (примерно 15 концентраций). На полоске сверху обозначена шкала значений МПК. Полоски помещают на агаровую среду, предварительно засеянную

изучаемым микроорганизмом. После инкубации ( $17\pm 1$ ) ч можно увидеть зону подавления роста микроорганизма в виде эллипса. Это происходит из-за градиента концентраций антибиотика, причём подавление роста вокруг полоски - там, где концентрация антибиотика выше МПК. Процедура тестирования заключается в регистрации МПК на пересечении эллипсоидной зоны подавления роста с краем полоски [117, 121, 135, 177]. Однако, высокая стоимость расходных материалов не позволяет этому методу использоваться широко [52].

## **1.2. Микробиота глаза в норме и при патологии**

Одним из величайших достижений медицины начала 21 века стал прогресс в понимании микробиоты человека. Многие участки тела, включая кишечник, рот и кожу, обычно заселены большим и разнообразным консорциумом бактерий, грибов и вирусов. Появление независимых от культивирования методов микробной идентификации, таких как полимеразная цепная реакция и секвенирование рибосомной ДНК 16S, предоставило гораздо более подробную картину консорциума бактериальных микробов человека, чем это было доступно с помощью традиционных методов культивирования. Микробиота лежит в основе патофизиологии в большей степени, чем считалось ранее [224].

В офтальмологии первоначальное описание результатов посева нормальной конъюнктивы было опубликовано Р. Кейлти в 1930 г. [180]. Он обнаружил, что 43% конъюнктивальных культур здоровых людей оказались «стерильными». Р. Перкинс и его коллеги изучили культивируемую микробиоту поверхности глаза в нормальной и инфицированной конъюнктиве с использованием более современных методов культивирования [202]. Эта группа обнаружила бактериальные изоляты в 87 из 96 контрольных глаз, причем первичными микроорганизмами были коагулазонегативные стафилококки.

На фоне антибиотикотерапии после операций, травм, ожогов, при нарушениях обмена веществ меняется видовой состав микробиоты. Согласно данным Околова И.Н. с соавт. (2009) видовой состав микробиоты в конъюнктивальном мешке зависит от таких факторов, как процессы метаболизма и продукции

ферментов, конкуренции за питательные вещества, климата, географии, пола и возраста [84]. Выявлено, что состав микробиоты конъюнктивальной полости и ее размножение контролируется самим организмом с помощью механических (десквамация эпителия, смывание слезой, мигание), химических (рН секрета, протеолитические ферменты слезы), бактерицидных (компоненты неспецифической иммунологической защиты, содержащиеся в слезной жидкости секреторные иммуноглобулины) факторов [109].

Микробной спектр конъюнктивальной полости довольно обширен. Установлено, что для спектра наиболее характерны *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, аэробные коринебактерии. Помимо вышеуказанных микроорганизмов, в составе микробиоты обнаружены альфа-гемолитические стрептококки, грамотрицательные бактерии и микрококки [218].

Инфекционная патология при заболеваниях глаз приводит к изменению состава конъюнктивальной микробиоты. Более 75% микроорганизмов при бактериальной инфекции глаз представлены коагулазонегативными стафилококками. Такие данные были получены Околовым И.Н. и соавт. при обследовании пациентов с острыми и хроническими конъюнктивитами [84,85].

Боровских Е.В. и соавт. изучали этиологические факторы инфекционно-воспалительных заболеваний глаз с целью оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [13]. Учёными были проведены 1726 бактериологических исследований биологического материала (мазки с конъюнктивы, соскобы с роговицы). В результате были выделены бактерии в 42,8%. В 94,72% случаев были обнаружены грамположительные микроорганизмы, представленные *S. aureus* (19,76%), *S. epidermidis* (42,9%), *S. haemolyticus* (12,2%), *S. intermedius* (1,9%). Грамотрицательные микроорганизмы обнаружены в 5,28% и были представлены *Klebsiella oxytoca* (0,7%), *E. coli* (0,5%), *Citrobacter* (0,5%), *Proteus* (0,8%), *P. aeruginosa* (1,0%). Также были выделены грибы (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*). Наибольшая чувствительность выделенных микроорганизмов установлена к таким современным антибиотикам, применяемым в

офтальмологической практике, как тобрамицин (87%), офлоксацин (72%), ципрофлоксацин (71%).

В.О. Анджелов с соавт. (2007) выявил, что полноценная диагностика в офтальмопатологии предусматривает оценку специфического гуморального и клеточного иммунного ответа на предполагаемый возбудитель [3, 4].

Конькова А.Ю. в 2019 г. сравнивала биологические свойства бактерий рода *Staphylococcus* и геноварианты *S. aureus*, выделенных из слезной жидкости пациентов с эндогенными увеитами для определения степени родства изолятов [53,55]. Получены данные о том, что контаминация слезной жидкости у больных с различной офтальмопатологией обусловлена перемещением микроорганизмов из носоглотки [56]. Чаще всего, микроорганизмы *S. aureus* являются причиной инфекционных осложнений поражений глаза. При этом особая роль принадлежит наличию фона резидентного бактерионосительства этих штаммов, как фактора риска развития инфекции [54].

Кочергин с соавт. (2012) суммировал данные о выделении различных видов микроорганизмов [57]. Околов И.Н. и соавт. (2008) чаще всего в отделяемом из конъюнктивальной полости глаз выделяли при бактериальной инфекции коагулазонегативные стафилококки, причём среди обнаруженных грамположительных кокков доля коагулазонегативных стафилококков составила более 75%. Учёными обнаружена резистентность коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных конъюнктивитами, к антибиотикам, применяемым для лечения данной патологии. Данные о видовом составе микроорганизмов, высеваемых при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях переднего отрезка глаза по данным разных исследователей, представлены в таблице 2 [18, 20, 39, 78, 101, 102].

Истинная микробиота поверхности глаза будет характеризоваться сохранением стабильного консорциума жизнеспособных микроорганизмов на поверхности глаза с течением времени. Инфицирование *S. aureus* после повреждений поверхности глаз было продемонстрировано и высказано предположение, что оно связано с дефицитом врожденных иммунных ответов [224].

Таблица 2 - Частота выделения различных видов микроорганизмов из конъюнктивы при различных патологиях переднего отрезка глаза

Возбудитель	Частота	Источники [18, 20, 78, 84,109, 102]
<i>S. epidermidis</i>	> 48	Воронцова Т. Н. с соавт. (2010); Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008); Майчук Ю.Ф.(2012)
<i>S. aureus</i>	40-65	Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008); Майчук Ю.Ф. (2012)
<i>Staphylococcus spp.</i>	> 20	Воронцова Т. Н. с соавт. (2010); Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф. (2012)
<i>Streptococcus spp.</i>	> 7	Шаимова В.А. (2001); Околов И.Н. с соавт. (2008)
<i>S. pneumoniae</i>	> 6	Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф. (2012)
<i>H. influenzae</i>	> 5	Шаимова В.А. (2001)
<i>P. aeruginosa</i>	> 4	Шаимова В.А. (2001); Майчук Ю.Ф. (2012)

Современные знания о микробиоме глаз человека возникли в результате комплексных анализов, проведенных с использованием геномной технологии. Хотя верно то, что слезная пленка является важным физическим барьером между глазом и окружающей средой, следует отметить, что комменсальные бактерии на поверхности глаза также играют роль как в адаптивном, так и врожденном иммунитете [165]. Действительно, глаз установил гармоничные отношения с комменсальными бактериями на поверхности глаза. Например, в модели клеточной культуры, здоровые эпителиальные клетки роговицы и конъюнктивы не вызывали воспалительной реакции при контакте с симбиотическими бактериями, такими, как *S. epidermidis* или *Propionibacterium acnes*. И наоборот, эпителиальные клетки глаза продуцировали воспалительные цитокины (ИЛ-6 и ИЛ-8), когда они подвергались воздействию таких патогенов, как *P. aeruginosa* [139].

Ранее считалось, что коагулазоотрицательные стафилококки, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.* и *Streptococcus* составляли основную часть микробиома поверхности глаза [148]. Некоторые вариации, описанные как комменсальные микробы глазного микробиома, включали также *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Megasphaera elsdenii*, *Bacteroides urealyticus*, *Bacteroides pneumosintes* [167, 182, 194]

В недавнем систематическом обзоре, посвященном 11 опубликованных контролируемых групп микроорганизмов, авторы использовали секвенирование 16S рРНК для определения на уровне типа наиболее часто присутствующих бактерий или основных родов. В обзоре показано, что *Corynebacterium* присутствовали во всех группах (11/11), что составляет среднюю долю 10% видов, обнаруженных в микробиоте глаза. За *Corynebacterium* следовали *Acinetobacter* (9/11; 6%), *Pseudomonas aeruginosa* (8/11; 19%), *Staphylococcus spp.* (7/11; 6%), *Propionibacterium spp.* (7%) и *Streptococcus* (3%) (оба 5/11). Бациллы, хотя и не считались частью основного микробиома (4/11), были довольно распространены (8%). Было обнаружено, что основными типами являются протеобактерии (*Pseudomonas*), актинобактерии (*Corynebacterium* и *Propionibacterium*), *Firmicutes* (*Staphylococcus* и *Streptococcus*) и *Bacteroidetes* [130].

Не менее важную роль в поддержании интраокулярного гомеостаза играет конъюнктивальная нормальная микробиота [122]. Конъюнктивальная микробиота имеет особенные отличия от других микробных сообществ, к примеру, в ней никогда не определяются лакто- и бифидобактерии, а слезная жидкость сдерживает рост популяций многих микробов (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* и др.). Однако, собственная условно-патогенная микрофлора может становиться источником бактериального роста вплоть до панофтальмита. Постоянно совершенствуются методы оценки конъюнктивальной микрофлоры [221]. К примеру, уже используется новая технология детектирования микроорганизмов по нелетучим жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. По данным Кузнецовой О.Ю. определение микробиоценоза глазной поверхности методом газовой

хромато-масс-спектрометрии позволяет качественно и количественно оценить микробиоценоз глазной поверхности и индивидуально подобрать эффективную антимикробную, этиологическую и патогенетическую терапию [59].

Культуральные исследования выявили изменения в микробиоте конъюнктивы в течение жизни человека. Конъюнктивита новорожденного имеет более высокий уровень грамположительных культур и большее видовое разнообразие по сравнению с другими моментами жизненного цикла человека. Хотя в ней доминируют коагулазонегативные стафилококки и пропионибактерии, конъюнктивита также содержит микробиоту, сходную с шейкой матки, и через 2 дня из конъюнктивы выделяется меньше микробов (включая патогенные бактерии) [200]. В возрасте от 3 лет аэробные кокки и *Propionibacterium* являются наиболее распространенными в младшей возрастной группе, количество которых с возрастом уменьшается. Однако повышенная доля анаэробных кокков среди анаэробов с возрастом увеличивается [215].

С помощью секвенирования 16S рРНК в первом исследовании были обнаружены различия в микробиоме взрослых старше 18 лет со средним значением  $38 \pm 10$  лет [198]. Однако, другое исследование показало, что, хотя пол не влиял на микробное разнообразие, у детей наблюдалось значительно более высокое богатство и индекс Шеннона [229].

В 2017 году Вен и др. обнаружили, что мужские и женские группы различаются только разнообразием бактериальных сообществ. Это же исследование показало, что молодые люди резко отличаются от пожилых людей с точки зрения разнообразия культур микроорганизмов. Возрастные группы показали значительные различия и в метаболических функциях. Результаты исследования свидетельствуют о том, что возраст является фактором риска, в процессе старения меняется иммунный гомеостаз поверхности глаза за счет изменений ее комменсального микробиома [222]. В предыдущих отчетах указывалось, что дисбаланс половых стероидов после менопаузы вызывает глубокие изменения на поверхности глаза, тем самым предрасполагая женщин ко многим аутоиммунным, воспалительным и аллергическим заболеваниям глаз, включая синдром сухого глаза [219].

Выявлено, что у тех, кто носит мягкие контактные линзы, межиндивидуальная вариабельность микробиоты глаза выше, чем у тех, кто не носит линзы [129]. Микробиом изменяется при ношении контактных линз и это изменение может быть фактором риска развития инфекции. Рядом учёных выявлен статистически значимый более высокий уровень грамтрицательных микроорганизмов, выделенных от пациентов с диабетом [116], а также более высоких показателях выделения *S. aureus* у пациентов с диабетом [195]. Исследование выявило изменения в составе флоры поверхности глаза со значительно более высокой частотой *Staphylococcus spp.* у пациентов с хроническим алкоголизмом по сравнению с населением в целом [170]. Сообщается о более высоких частотах выделения *S. aureus*, коагулазонегативных стафилококков и коринебактерий у лиц с синдромом сухого глаза и дисфункцией мейбомиевых желез. *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *P. acnes*, *H. influenzae* выделяли у больных с трансплантатом глаза [208].

С появлением секвенирования 16S рРНК стало возможным обнаруживать ранее не описанные бактерии, более сложные сообщества и устойчивые к антимикробным препаратам культуры бактерии. С помощью нового метода основные бактерии (40% от общей поверхности глаза) поверхностного микробиома у здоровых людей были лучше определены на уровне типа. Основные бактерии, в том числе актинобактерии, составляют ровно 53% микробиома поверхности глаза, за ними следуют протеобактерии, составляющие 39%, стафилококки и стрептококки 8% [148].

Обобщая результаты этого обзора, можно сказать, что нормальные микробиомы различаются по методам исследования, полу, географическому распределению, использованию глазных капель, контактных линз и таких факторов, как диабет, алкоголизм, сухость глаз и аллергический конъюнктивит. В прошлые годы бактерии в основном изучались в связи с патологиями и с упором на диагностику и терапию. В настоящее время придаётся значение иммуномодулирующим функциям и взаимоотношениям между микробами, глазами и другими органами. Согласно современным исследованиям микробиоты глаза описано большое

разнообразие бактерий, зависящее от методов их выявления, в связи с чем представляется интересным получить собственные данные.

### **1.3. Биопленки при инфекциях глаз**

Способность образовывать биопленки в различных средах является общей чертой бактерий и может представлять собой один из самых ранних защитных механизмов. Понимание того факта, что в природе бактерии прилипают ко многим абиотическим или биотическим поверхностям и образуют сообщества дифференцированных, взаимодействующих сообществ, известных как «биопленки», появилось за последние несколько десятилетий [146]. Доказательства образования биопленок были обнаружены при анализе микробных окаменелостей, в том числе из глубоководных гидротермальных отложений. Это говорит о том, что способность образовывать биопленку является древней адаптацией, возраст которой превышает 3 миллиарда лет [205].

Глаз имеет ряд защитных механизмов, включая компоненты слезной жидкости (лизоцим, иммуноглобулины, лактоферрин, липокалин,  $\beta$ -лизин и др.), которые действуют как первая линия защиты от бактериальной инфекции [114, 174, 224]. Мигание век также играет важную роль в распространении слез по поверхности глаза и, таким образом, действует как барьер к микробной колонизации поверхности глаза [50]. Роговица обладает иммунной системой [174] состоящей из врожденной клеточной защиты (эпителиальные клетки роговицы, нервы роговицы, кератоциты, полиморфноядерные клетки, нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги, НК-клетки, клетки Лангерганса и др.). Для элиминации возбудителей задействованы и молекулярные элементы (составные компоненты комплемента, интерфероны, интерлейкины) [139]. Несмотря на эти защитные механизмы, многие микроорганизмы действительно выживают на поверхности глаза и недавние исследования, основанные на амплификации, клонировании и секвенировании, выявили большую степень разнообразия и обилие бактерий в микробиоме глазной поверхности [156].

Вирулентность микроорганизмов на поверхности глаза зависит от их способности образовывать биопленку, которая придает антимикробные свойства [223].

Биопленка – это сообщество микробов, изолированных в самосекретирующем матриксе, внеклеточном полимерном веществе [185]. Биопленка, помимо наличия в ней микробных клеток, постоянно развивается и имеет определенную уникальную архитектуру [129]. По структуре – это каналы [221] различной толщины, от клеточного монослоя до трехмерной структуры, похожей на столбцы, разделённые пустотами. После того, как биопленка созрела и достигла достаточных размеров, происходит отслоение клеток и образование пустоты [38]. В фазе биопленки микробные клетки защищены от внешней агрессии среды и механизмов защиты хозяина [155]. Характерная черта бактерий, находящихся в биоплёнке это переход от планктонной фазы к малоподвижной жизни на поверхности [229]. Этот переход происходит в четыре отдельные стадии: адгезия (когда планктонные клетки прилипают к субстрату), образование микроколоний (когда бактерии размножаются и организуются в многослойные клеточные структуры), созревание (когда появляется биопленка в виде вертикальных столбцов или грибовидных трехмерных сборок) и, наконец, фаза диспергирования. В фазе расселения отдельные клетки или многоклеточные агрегаты рассеиваются из зрелых биопленок в новые биопленки [140]. Нежизнеспособный компонент биопленки представляет собой желеобразный материал, состоящий из белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, липидов, мертвых бактериальных клеток и других полимерных веществ, гидратированных до 85–95% воды [130]. Матрикс поддерживает структурную целостность биопленки, прикрепляет биопленку к субстрату [198], облегчает коммуникацию бактерий и их жизнеспособность: диффузию кислорода и транспорт молекул внутри биопленки [209]. Биопленки образуют более 80 процентов микроорганизмов, защищаясь от разрушающего действия антибиотиков, дезинфицирующих средств и иммунного ответа хозяина.

Исследования также подтверждают появление устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов при формировании биоплёнки [167]. Так, обнаружено, что выделенные из конъюнктивы *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.* образуют биопленки, устойчивые к антибиотикам. Выявлено, что минимальная подавляющая концентрация антибиотика в фазе биопленки была значительно выше, чем в

планктонной фазе. Это демонстрировало неэффективность проникновения антибиотика в биопленку и неспособность препарата оказывать свое действие внутри биопленки, что потенцировало появление клеток-персистеров, устойчивых к лекарствам. Выявлена способность бактерий выживать в условиях ограничения питательных веществ и кислорода и повышение уровня генной лекарственной устойчивости, способность матрикса ограничивать диффузию аминогликозидов, способность инактивировать антибиотики, приобретая устойчивость к фагоцитозу.

Инфекции глаза, образующие биоплёнку, представлены преимущественно грамположительными микроорганизмами, происходящими из микробиоты поверхности глаза (Таблица 3). Коагулазоотрицательные стафилококки, особенно *S. epidermidis*, являются наиболее часто встречающимися микробами при культурально подтвержденном остром эндофтальмите [173]. *P. acnes* ассоциируется с более вялотекущей и персистирующей инфекцией, с меньшей частотой гипопиона и лучшим окончательным визуальным исходом по сравнению с острыми случаями. Оба возбудителя, *S. epidermidis* и *P. acnes*, способны прилипать и образовывать биопленки. Некоторые данные свидетельствуют о том, что они могут также прикрепляться и образовывать биопленки в заднем капсульном мешке [199]. Частота контаминации колеблется от 2% до 46% и связана с наиболее распространенными грамположительными комменсальными микроорганизмами, обнаруживаемыми на поверхности глаза, чаще всего *S. epidermidis* [228].

По сравнению с водянистой влагой, стекловидное тело относительно статично и представляет собой благоприятную среду для развития инфекции. Интраокулярные линзы, например, изготовленные из полиметилметакрилата, могут контаминироваться комменсальными конъюнктивальными бактериями (в основном *S. epidermidis*) во время введения и переносят микроорганизмы с поверхности глаза в заднюю камеру [169]. Характерными признаками инфекций, связанных с биопленками, является позднее начало и сложность лечения антимикробной терапией (Таблица 3).

Таблица 3 - Инфекции глаза, связанные с биопленкой

Болезнь	Основные возбудители инфекции и/или обнаруженные в биопленках	Локализация биопленки
Эндофтальмит	Коагулазоотрицательные стафилококки и <i>P. acnes</i>	Интраокулярная линза
		Задняя капсула
Кератит	<i>S. aureus</i> и другие виды стафилококков, <i>P.aeruginosa</i> и <i>Serratia</i> spp. Грибы и акантамебы реже	Контактные линзы
		Строма роговицы (кристаллическая кератопатия)
Инфекция склеральной пружки	Грамположительные кокки и нетуберкулезные микобактерии	Склеральные пружки
Инфекции слезной системы	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> и <i>M. chelonae</i>	Устройства для интубации слезных путей
		Пунктуальные пробки
Периорбитальные инфекции	<i>Staphylococcus</i> spp. биопленки смешанных видов	Розетки и орбитальные пластины

Поскольку доказательства участия микробных биопленок в инфекциях глаза стали убедительными, разработка новых стратегий для предотвращения их образования или их уничтожения стала приоритетной задачей.

#### 1.4 Роль цитокинов в формировании защитных механизмов органа зрения

Сравнивая данные исследователей, можно сделать вывод о том, что многие микроорганизмы (*S. epidermidis*, *S.aureus*, *Streptococcus* spp., *S. pneumoniae*) выделяются как в конъюнктивах клинически здоровых индивидуумов, так и в конъюнктивах при различных патологиях глаза. Данный факт говорит о сдерживании

силами иммунной системы роста условно-патогенной бактериальной популяции в норме [38]. Снижение иммунитета приводит к резкому возрастанию численности популяции микробов сапрофитов и затем к инфекционно-воспалительному повреждению тканей глаза [60]. Отсутствие инфекционно-воспалительных изменений глаза обеспечивается каскадом оборонительных иммунных механизмов от внешних и внутренних раздражителей, к примеру, секретией определенных нейтрализующих веществ (цитокинов, гормонов, гормоноподобных веществ). При снижении уровня иммунных клеток под действием различных факторов (травмы, ожоги, инфекции) происходит увеличение численности микробов-сапрофитов. Это приводит к интенсивному проникновению и размножению бактерий [58].

Каждый цитокин часто имеет много функций и может продуцироваться такими клетками семейства, как интерфероны, факторы некроза опухоли, факторы роста, лимфокины и хемокины (Таблица 4).

Таблица 4 - Основные цитокины, их свойства и концентрация в передней камере глаза [58]

Цитокины	Продуценты в тканях глаза	Основные эффекты	Концентрация в водянистой влаге, пг/мл
ИЛ-1	Клетки Лангерганса, макрофаги, клетки конъюнктивы, эпителий и строма роговицы, В-лимфоциты	Дифференциация лимфоцитов, хемоаттракция; рост адгезивности сосудистого эндотелия, прокоагулянтной активности, дегрануляция базофилов, секреция провоспалительных цитокинов, простагландинов, коллагена, фибронектина	ИЛ-1 $\alpha$ 0,5-5 ИЛ-1 $\beta$ 0,7-24
ИЛ-2	Активированные Т-лимфоциты и NK-клетки	Дифференциация Т- и В-лимфоцитов, активация моноцитов и макрофагов, секреция провоспалительных цитокинов	1,42-24
ИЛ-4	Базофилы, Th2-клетки	Пролиферация и дифференцировка Т- и В-лимфоцитов, снижение секреции ИЛ-1, ФНО, ИЛ-6; рост цитотоксической активности и миграции макрофагов, стимуляция секреции колониестимулирующих факторов	1,85-10
ИЛ-6	Базофилы, макрофаги, эпителий роговицы и конъюнктивы, строма роговицы, сосудистый эндотелий, Th2-клетки	Регуляция уровня воспаления, регуляция кровотока, секреция плазматических клеток, ингибирование синтеза ИЛ-1 и ФНО	5,8-438
ИЛ-8	Строма роговицы, макрофаги, эндотелий сосудов	Хемотаксис нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, стимуляция ангиогенеза	4,94-64

Продолжение таблицы 4

ИЛ-10	Эпителий конъюнктивы и роговицы, Th2-клетки, моноциты, макрофаги	Снижение продукции провоспалительных цитокинов, секреция антагониста рецепторов к ИЛ-1, снижение адгезивности лейкоцитов	0,7-7
ФНО	Макрофаги, Т- и В-клетки, эндотелий роговицы и конъюнктивы, трабекулярная сеть, базофилы	Провоспалительная активность, схожая с ИЛ-1 и ИЛ-6	0,88-3,1
ИФН- $\gamma$	Строма роговицы, активированные Т-лимфоциты, NK-клетки	Рост секреции макрофагов, ингибирование секреторной активности Th2-клеток	1,49-5,1
ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$	Эпителий роговицы; ИФН- $\alpha$ — моноциты, макрофаги, фибробласты, В-лимфоциты; ИФН- $\beta$ — фибробласты, макрофаги	Стимуляция синтеза ИЛ-1 и ИЛ-2. В высоких концентрациях ингибируют гуморальный и клеточный иммунитет, в умеренных осуществляют иммунорегуляцию	
ТФР- $\beta$	Макрофаги, клетки цилиарного тела и трабекулярной сети	Ингибирование воспаления, роста эндотелия, ангиогенеза, пролиферации клеток цилиарного тела; синтез внеклеточного матрикса, активация фибробластов	ТФР- $\beta$ 1 — остаточное количество ТФР- $\beta$ 2 39,9-1680
Тромбоцитарный фактор роста	Эпителий роговицы, тромбоциты	Пролиферация роговичного эпителия, стимуляция миграции фибробластов и эпителия, хемоаттракция, синергизм действия ТФР- $\beta$ на фибробласты	Остаточное количество
Фактор роста фибробластов	Эндотелий роговицы и сосудов	Стимуляция митоза клеток эпителия и стромы роговицы, снижение синтеза ТФР- $\beta$	1,07-20,66
Сосудистый эндотелиальный фактор роста	Кератоциты, эпителий роговицы, тромбоциты, макрофаги	Ангиогенез, ингибирование апоптоза, АПК, индуцирование протеиназ	7,8 $\pm$ 5,9

Если посредством травмы, ожога, инфекции, нарушаются иммунологические механизмы защиты, то это приводит к проникновению внутрь глаза экзо- и аутоантигенов. В этом случае в тканях глаза, по мнению Керимова и соавт. (2005), формируется определенный тип реагирования — повышается уровень провоспалительных цитокинов: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Таблица 4) [47].

Феномен иммунологически привилегированного органа возник у глаза как физиологический процесс [9, 41, 91, 99]. Учёными установлено, что содержание иммунологической привилегированности заключается в действия ряда факторов и особом сосудистом русле, заключающимся в отсутствии лимфатического оттока у

сосудов крови на фоне афферентного типа дренажа. Такой гемато-глазной барьер обуславливает прочную защиту от чужеродных микроорганизмов [104, 132, 174]. Помимо этого, существует иммуносупрессивное микроокружение (ТФРР,  $\alpha$ -МСГ, ВИП), CD8<sup>+</sup>-лимфоциты. Цитокины являются группой белковых медиаторов, выполняющих регуляторную функцию процесса заживления на всех его стадиях [1, 97, 153]. Ряд учёных, анализируя содержание цитокинов в жидкости передней камеры глаза, в норме отмечают преобладание содержания противовоспалительных цитокинов над провоспалительными (Таблица 5) [148, 224].

Таблица 5 - Уровни содержания исследуемых цитокинов в слёзной жидкости при различных видах офтальмопатологии

<b>Офтальмопатология</b>	<b>Выявленные изменения в уровнях цитокинов (в слезной жидкости методом ИФА)</b>	<b>Источники [1, 44, 46,103]</b>
Хламидийный конъюнктивит	↑IL-1 $\beta$ , ↑IL-6, ↑IFN $\gamma$	Авдеева Ж.И. (2002)
	↑ IL-1 $\beta$ , ↑TNF $\alpha$	Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б. (2007)
	↑IL-4 (хроническое течение)	Шевчук Н.Е. (2007)
Герпетический кератит и кератоувеит	↓IFN $\alpha$	Ковалёва Л.А.(2013)
	↑IL-1, ↑IL-6, ↑TNF $\alpha$ , ↑IFN $\gamma$	Шевчук Н.Е. с соавт. (2005, 2007)
Аденовирусный конъюнктивит	↑IL-1, ↑IL-6, ↑TNF $\alpha$	Авдеева Ж.И.(2002)
	↑IL-6	Шевчук Н.Е. (2009)
Травмы глаза (средней степени и тяжелые)	↑IL-1 $\beta$ , ↑IL-2, ↑TNF $\alpha$	Ковалёва Л.А.(2013)
Ожоги глаз	↑IL-1 $\beta$ , ↑TNF $\alpha$ , ↑IL-6, ↑IL-4	Керимов К.Т. с соавт. (2005)
Болезнь трансплантата после кератопластики	↑IL-1 $\beta$ , ↑IL-2, ↑TNF $\alpha$	Авдеева Ж.И. (2002)

*Примечание:* ↑ — повышенное содержание цитокина по сравнению с нормой, ↓ — снижение продукции цитокина по сравнению с нормой

Таким образом, дальнейшее изучение микробиоты и иммунологических механизмов органа зрения позволяет более предметно объяснить патогенез травматического, ожогового и инфекционного воспаления глаза.

## **1.5 Механизмы повреждения роговицы при ожогах и современные методы лечения**

Актуальность проведения полноценного лечения пациентов с ожогами роговицы основана на необходимости учёта роли антибиотико-резистентной микрофлоры в офтальмопатологии. В подавляющем числе случаев происходит инфицирование ожога [17]. Причиной такой ситуации является поливалентная устойчивость микроорганизмов к применяемым антимикробным препаратам. По данным Майчук Ю.Ф. (2010), исходы бактериальных осложнений ожогов роговицы составляют до 25% случаев инвалидности по зрению [74]. Наиболее сложно протекают случаи с центральным расположением дефекта, что значительно снижает качество жизни пациентов [94]. Химические ожоги глаза приводят к нарушению целостности роговицы. По данным Пронкина И.А. и соавт. (2015), в нормальном состоянии незначительные поверхностные ожоги могут самостоятельно регенерировать в течение 1-7 суток [91]. При глубоком химическом ожоге роговицы с поражением базальной мембраны, инфекционно-воспалительным процессом, наличием лимбальной недостаточности, дистрофическими изменениями ткани роговицы, нейротрофическими поражениями - нарушаются процессы нормальной эпителизации, что приводит к возникновению хронического или рецидивирующего дефекта ткани [94]. Такие поражения переднего отрезка глаза являются одной из наиболее обширных и тяжело поддающихся лечению патологий. Нередко осложнения химических ожогов глаза инфекционно-воспалительного характера приводят к инвалидизации [63, 71,72]. Ожог глаз инициирует действие многочисленных процессов, нарушающих работу сосудистого тракта, склеры, конъюнктивы, роговицы и других структур глаза. По различным оценкам [2, 22, 23, 73] около 20% населения страдает от травмы глаз в течение всей своей жизни. Таким образом, более миллиона человек в год получают травмы органа зрения. Эти высокие цифры иллюстрируют необходимость лучшего понимания механизмов заживления роговицы и разработки эффективных способов ускорения и улучшения заживления ожоговых ран. Химические щелочные ожоги растворяют белок тканей и способствуют развитию некроза внутренних структур глаза. Процесс

развития ожога включает ряд связанных событий, которые имеют общую тему восстановления раны клетками роговицы [25, 26, 41]. Авторами установлено, что в результате каскада патологических реакций, спонтанная регенерация эпителия замедляется или не происходит. Вначале эпителиальный дефект роговицы в последующем сопровождается инфильтрацией стромы полиморфноядерными лейкоцитами, изъязвлением и задержкой процессов регенерации роговицы в фазе протеолитического заживления [39, 80]. В дальнейшем развивается десметоцеле (разрушение стромы до десцеметовой мембраны с протрузией и перфорация (прободение), что нередко приводит к гибели глаза. В этой связи, основным методом лечения легких и средних ожогов глаз является регенерация роговицы [71,74]. Анатомические и функциональные нарушения приводят к потере прозрачности, появляются персистирующие эрозии и язвы, наступает васкуляризация роговицы. Значительное снижение остроты зрения нередко приводят к поиску наиболее эффективных методов лечения переднего отрезка глаза [64, 65, 76, 78, 81, 88, 89, 90, 98]. Лечение ожоговых дефектов роговицы является комплексным и включает различные комбинации лекарственных средств [15, 16, 21, 36, 86, 87, 92, 93, 101, 102, 103, 113]. Патологические реакции заживления сопровождаются нарушением окислительно-восстановительных процессов, снижением рецепторной вооруженности клеточных мембран, а также, нарушением основных ферментативных взаимодействий и снижением продукции цитокинов [33, 44, 107].

Последние достижения медицины в области лечения повреждений слизистой оболочки глаз связаны с использованием новых биологических модуляторов. К ним относятся низкомолекулярные пептиды с факторами роста и цитокинами (включая ингибиторы передачи сигналов и микро РНК), генная терапия, стволовые клетки, а также использование наноконтейнеров для адресной доставки [34, 35, 108, 128, 129, 130]. Рядом учёных доказано, что для стимуляции регенеративных процессов в роговице перспективным является использование капель гомологичного фибронектина [32]. Авторами выявлено положительное влияние инстилляций фибронектина на раневой процесс в роговице при ожоговой болезни глаз.

Низкомолекулярные плацентарные пептиды содержат большое количество различных факторов роста, цитокинов и помимо регенераторного механизма, обладают, ещё и иммуностропным действием, обеспечивая антимикробный эффект [141,159]. Пептиды опосредуют различные функции клеток, включая внутриклеточные и межклеточные сигнальные молекулы, в том числе интерлейкины, потенцирующие Т-клетки иммунной системы, реагирующие на микробные агенты. Тем не менее, повышение эффективности ранозаживления различных клеток роговицы является главным эффектом действия пептидов. Стволовые клетки, находящиеся в роговично-клеточном соединении и лимбе, обеспечивают запас пролиферирующих клеток для регенерации роговичного эпителия, который является самообновляющейся тканью [19, 168, 183, 185]. По данным ряда авторов, ранозаживление включает миграцию клеток, пролиферацию, адгезию и дифференциацию с расслоением клеточного слоя [220, 225]. Передача сигналов эпидермального фактора роста включает в себя основной путь, который инициирует миграцию и пролиферацию клеток и стимулирует заживление раны эпителием роговицы [79, 197]. Zhang C. et al. (2016) установили, что в ранние периоды заживления эпителиальных ран роговицы, клеточная сигнализация приводит к миграции и пролиферации клеток в эпителиальных клетках [225]. Watane, A. et al. (2019), исследуя эпителиальные раны роговицы, также продемонстрировала, что сигнальные пути играют важную роль в самовоспроизведении роговичного эпителия и заживлении ран [221].

Центральное место в лечении инфекционных осложнений ожогов глаз занимают гелевые антимикробные композиции [143, 150, 227]. Авторами показано, что в зависимости от тяжести клинического поражения, они могут содержать антимикробные, противовоспалительные, антиаллергические средства, а также стимулирующие иммунную систему. Учёными сделан вывод о целесообразности применения комплексных препаратов, содержащих противовоспалительные и антибактериальные средства, к примеру, кортикостероид + антибиотик. Таким образом, антимикробная терапия, регенерация повреждённой ткани в комплексе с

воздействием на клетки иммунитета - являются главными направлениями наружного лечения инфицированных ожогов роговицы.

Одним из перспективных методов лечения ожогов роговицы может быть применение плацентарных пептидов. Ранозаживляющая роль пептидов заключается в их мощном регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза, к тому же показано, что плацентарные пептиды обладают мощным антимикробным действием.

Инфекционные осложнения ожогов обусловлены появлением антибиотикорезистентной микрофлоры, загрязнением окружающей среды, бесконтрольным применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, смены микробных возбудителей, повышения роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры в развитии инфекционных осложнений ожогов глаз [18, 77, 100]. В результате, несмотря на применение мощного арсенала традиционного лечения, такие бактериальные осложнения относятся к тяжелой патологии органа зрения [14, 42, 43, 45, 46]. Все это объясняет необходимость поиска новых антимикробных средств при антибиотикорезистентности и изучения их антибактериальной эффективности в современных условиях.

### **1.6. Нанотехнологии для доставки антимикробных пептидов**

Учёными отмечено, что лекарственная устойчивость рассматривается как специфическая реакция бактерий на повреждение, вызванное антибиотиками, что означает, что ее нельзя полностью избежать, даже если будет создан новый антибиотик [192]. Повышение уровня устойчивости к антибиотикам, лекарственной аллергии и нехватки антибиотиков еще больше усложняет выбор антибактериальных средств [164]. Проблемы, с которыми сталкиваются традиционные противомикробные препараты, включают устойчивость к лекарствам, передозировку и цитотоксичность [138]. В этой связи очевидна необходимость создания эффективной и безопасной системы высвобождения лекарств, которая может задерживать высвобождение токсичных антимикробных агентов и снижать риск бактериальной устойчивости к лекарствам.

Поиск, разработка и изучение эффективности новых антимикробных и ранозаживляющих наружных средств, позволяющих провести полноценное восстановление зрительных функций, особенно после осложнения ожогов роговицы антибиотико-резистентными микроорганизмами, являются важной задачей для клинической микробиологии и офтальмологии [120].

В последние годы появилась альтернатива традиционным антибиотикам. Это антимикробные пептиды, обладающие антимикробными свойствами (особенно короткими последовательностями) из-за их ионной структуры. Эти свойства помогают им не вызвать резистентность бактерии или образование биопленки [179,204, 211]. Однако, антимикробные пептиды также являются гемолитическими, токсичными и легко теряют эффективность, и, следовательно, им нужна эффективная система доставки лекарств, чтобы избежать этих побочных эффектов [183]. В этом случае использование наноконтейнеров для целевой доставки антимикробных пептидов, является весьма перспективным направлением.

В течение последнего десятилетия нанотехнологии оказали значительное влияние на медицину и способствовали ее улучшению. Учёные разработали инновационные системы доставки лекарств, демонстрирующие длительную физическую и химическую стабильность, легкие и надежные продукты, полезные функции и разумную стоимость. Наночастицы, липосомы, ниосомы, твердые липидные частицы, мицеллы, везикулы поверхностно-активных веществ и квантовые точки использовались для доставки лекарств, белков, пептидов, нуклеиновых кислот с различными физико-химическими и терапевтическими свойствами [201,206]. Наноконтейнеры, изготовленные из органических и биосовместимых материалов, представляют собой наилучшее решение для доставки пептидов. Фактически, они могут захватывать различные вещества, многократно снижая их токсичность и могут быть модифицированы путем конъюгирования с направляющими и селективными молекулами [207]. Наноконтейнеры могут также совместно доставлять как терапевтические молекулы, так и диагностические вещества. Наночастицы имеют размер от 10 до 1000 нм и могут быть синтезированы из липидов, белков и углеводов, а также нескольких натуральных и

синтетических полимеров [203]. Для доставки лекарство растворяют, инкапсулируют или присоединяют к матрице наночастиц. В зависимости от способа получения могут быть сконструированы наночастицы, наносферы или нанокапсулы. Системы наночастиц используются для различных биомедицинских применений [206]. К примеру, для улучшения терапевтического индекса инкапсулированных лекарств, либо путем защиты их от ферментативной деградации, изменения фармакокинетики, снижения токсичности или обеспечения контролируемого высвобождения в течение продолжительного периода времени. Наночастицы могут повышать пероральную биодоступность слаборастворимых лекарств и проникновение в ткани после парентерального введения через прилипание к капиллярной стенке. Они также улучшают доставку определенных лекарств через мембраны [168].

Применение наноконтейнеров позволяет обеспечить оптимальный процесс антимикробного воздействия и эпителизации раневой поверхности для повышения эффективности ранозаживления. Так, в практике была отмечена высокая эффективность антимикробного восстановительного лечения слизистой оболочки полости рта стоматологическим ниосомальным гелем [5]. Ниосомы являются наиболее перспективными наночастицами для доставки лекарств, и поскольку они неионные, они менее токсичны и улучшают терапевтический индекс лекарств, ограничивая их действие на клетки-мишени. Ниосомы представляют собой микроскопические слоистые структуры, которые образуются на примеси неионного поверхностно-активного вещества класса эфира алкила или диалкилполиглицерина и холестерина с последующей гидратацией в водных средах [131]. Они напоминают липосомы в своей архитектуре и могут быть использованы в качестве эффективной альтернативы липосомальным носителям лекарств [172]. Везикулы могут выступать в качестве депо, контролируя высвобождение. Ниосомы осмотически активны, стабильны и повышают стабильность инкапсулированного лекарственного средства [29]. Они улучшают пероральную биодоступность слабо абсорбированных лекарств и улучшают проникновение в кожу. Ниосомную дисперсию в водной фазе можно эмульгировать в неводной фазе для

регулирования скорости доставки лекарственного средства и введения нормального везикула во внешней неводной фазе. Ниосомы были предложены для ряда потенциальных терапевтических применений, то есть в качестве иммунологических адъювантов, противоопухолевых, антимикробных, противовоспалительных препаратов и в качестве диагностических средств визуализации [216]. Кроме того, ниосомы являются универсальными системами-носителями и могут управляться различными путями. Особые усилия были направлены на использование ниосом в качестве эффективных трансдермальных систем доставки лекарств с помощью наночастиц серебра [30, 161].

Создание высокоэффективного антимикробного средства с высокой проникающей способностью и длительным пролонгированным действием, необходимым для эффективной регенерации ожогов роговицы возможно с использованием вышеперечисленных нанотехнологий для направленной доставки. В этом случае необходима новая система доставки антимикробных пептидов с характеристиками замедленного высвобождения. Наноматериалы с присущей им антимикробной активностью или наноматериалы, которые могут повысить эффективность и безопасность антимикробных препаратов, называются наноантимикробными. Набор органических, неорганических и органических компонентов в структуре ниосомального геля контролирует высвобождение антимикробных пептидов [10]. На этот процесс могут оказывать влияние изменения pH, температуры, ферментативный катализ, ультрафиолетовое гамма-излучение и даже воспаление [12]. Антимикробный гель можно наносить на мочевые катетеры, центральные венозные катетеры, контактные линзы, суставные и зубные имплантаты для полного заживления ран. Различные типы гелей также обладают разнонаправленными антимикробными свойствами [147]. К примеру, ниосомальный гель обладает антимикробным действием за счёт самих ниосом кремнийорганической природы. В ниосомальных гелях антибактериальные пептиды можно использовать в более низкой дозе, чем при системном введении, что позволяет преодолеть проблему устойчивости и в некоторой степени уменьшить другие нежелательные побочные эффекты [11]. Антимикробные пептиды признаны в качестве возможного источника

панацеи для лечения устойчивых к антибиотикам бактериальных инфекций, поскольку они обладают высокой антимикробной активностью в отношении очень широкого спектра микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибы и вирусы [159]. Хотя до сих пор не достигнуто единое мнение о конкретном механизме АМП, известно, что АМП воздействуют на мембраны и, в конечном итоге, приводят к гибели бактерий [176]. Однако у АМП есть свои недостатки. Они не стабильны и легко биodeградируют. Более того, антимикробные свойства природных АМП не так хороши, как у антибиотиков. Чтобы преодолеть все эти недостатки, исследователи разработали некоторые рекомбинантные АМП с короткими цепями, которые обладают улучшенными антибактериальными свойствами [127, 128]. Однако, их высокая стоимость получения не позволяет наладить массовое производство.

Гели также могут быть хорошей наружной формой для АМП с целью предотвращения быстрой деградации. Последние достижения в области создания природных и синтетических гелей имеют свойство носителей. Гидрогели в качестве антимикробных биоматериалов могут быть альтернативой традиционным антибиотикам, поскольку из-за неправильного использования антибиотиков и других противомикробных препаратов было создано слишком много устойчивых к лекарствам бактерий [200]. Контролируемое и пролонгированное высвобождение, местное введение, стимулированное включение-выключение, повышенная механическая прочность и улучшенная биосовместимость - являются важными преимуществами, которые может принести широкое разнообразие гелей [87, 98, 105, 144]. Для лечения микробных инфекций крайне важно, чтобы антимикробные компоненты могли высвобождаться для проникновения в иммунные клетки и уничтожения патогенных микроорганизмов изнутри [70, 81, 123]. Гидрогели, содержащие антибиотики, наночастицы металлов, антимикробные полимеры и пептиды, могут устойчиво высвобождать антимикробные агенты, что важно для эффективного лечения инфекций и предотвращения образования биопленок [190, 222]. По данным ряда исследователей, высокоактивный антимикробный пептид иммобилизованный на поверхности гидрогеля на основе полиэтиленгликоля,

обладал бактерицидной активностью против *S. aureus* и *S. epidermidis* [131]. В исследованиях, проведенных учёными [175, 186, 189], мультидоменные пептиды продемонстрировали лучшую антимикробную активность в гидрогелях, чем в растворе. Было доказано, что гидрогели, содержащие цистеин и нитрат серебра, обладают определенной антибактериальной активностью [114]. Установлены более высокие значения индекса антимикробной биосовместимости по сравнению с синтетическими лекарственными средствами с аналогичными структурами [111, 150, 215]. Song et al. (2012) разработал клеточный адгезивный полипептид и гидрогель на основе ПЭГ с присущей ему антибактериальной активностью для заживления кожных ран [210]. Кроме того, Buhrman J.S. (2013) с соавторами иммобилизировал функциональный белок в микросферах полиэтиленгликоля, демонстрируя новый метод высокой терапевтической эффективности без токсичности [123]. В исследованиях Xie Z. et al. (2015) и др. биоразлагаемый гель, функционализированный АМП, обеспечивал превосходное ингибирование бактерий и способствовал заживлению ран без проявления цитотоксичности [220]. Интересно, что наноструктурированные гидрогели с D-аминокислотами и АМП продемонстрировали высокую антимикробную активность без цитотоксичности [199]. Эти исследования принесли возможность применения АМП в качестве антибиотиков в клинике. Кроме того, Bardajee GR. et al. (2012) были разработаны композитные гидрогели, снизившие минимальную дозировку антибиотиков [115]. Синергетический подход повысил эффективность композитных гидрогелей в решении проблемы устойчивости к антибиотикам и снижения побочных эффектов. Синергетически эффективные композитные гели продемонстрировали большой клинический потенциал, расширив антибактериальный спектр. Когда различные антимикробные ингредиенты были объединены в гель, антибактериальный спектр геля оказался более широким, и антимикробная эффективность выше по сравнению с гелями, загруженными одним агентом отдельно [115]. Благодаря рациональному дизайну, химическому составу синтетических полимеров и всесторонней оценке *in vitro* и *in vivo* гидрогелевые системы с широким спектром антимикробной активности против микробов с множественной лекарственной устойчивостью,

высокой селективностью и незначительной токсичностью могли бы найти большой потенциал в профилактике и лечении инфекций.

### **1.7. Заключение**

Исследования, направленные на поиск и изучение новых антимикробных препаратов, распространены и актуальны во всем мире [82]. Это связано с глобальной проблемой антибиотикорезистентности микроорганизмов. Инфекционные осложнения ожогов обусловлены появлением антибиотико-резистентной микрофлоры, а также загрязнением окружающей среды, бесконтрольным применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, смены микробных возбудителей, повышения роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры в развитии инфекционных осложнений ожогов глаз [93].

Альтернативой традиционным антибиотикам являются эндогенные антимикробные пептиды, обладающие антимикробными свойствами, не вызывающие резистентность бактерии или образование биопленки. Одним из перспективных методов лечения ожогов роговицы может быть применение комбинации антимикробных и регенераторных пептидов. Синергия таких пептидов заключается в их мощном антимикробном и регенераторном потенциале, значительно улучшающем эпителизацию роговицы и восстановление тканей глаза.

Такие контейнеры пролонгируют высвобождение компонентов, снижая токсичность и повышая эффективность. Они имеют длительную физическую и химическую стабильность, разумную стоимость. К ним относятся такие наночастицы, как липосомы, ниосомы, твердые липидные частицы, мицеллы, везикулы поверхностно-активных веществ [106, 125, 180, 229]. Применение наноконтейнеров позволяет обеспечить оптимальный процесс антимикробного воздействия и эпителизации раневой поверхности. Все это объясняет необходимость поиска новых антимикробных средств и изучения их свойств для повышения эффективности ранозаживления инфекционных осложнений, в том числе при ожогах роговицы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. Исследования микрофлоры у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы

На долю бактериальной инфекции приходится до 85 % всех от общего количества инфекций глаз [56]. Воспалительные процессы в роговице, обусловленные бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы, являются одними из самых тяжелых патологий органа зрения, нередко приводящих к гибели глаза [101, 102]. Рост такой патологии в большинстве случаев объясняется снижением иммунного статуса и резистентности к антибиотикотерапии [69]. Вначале эпителиальный дефект роговицы сопровождается инфильтрацией (просачивание) стромы полиморфноядерными лейкоцитами (нейтрофилы), изъязвлением, задержкой процессов регенерации роговицы в фазе протеолитического заживления с исходом в десметоцеле (разрушение стромы до десцеметовой мембраны с протрузией (выбухание) последней) и перфорацию (прободение), приводящих в ряде случаев к гибели глаза [221].

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 три группы – контрольная и две опытные по 100 человек. Исследовали микрофлору у пациентов с химическими ожогами различной локализации и этиологии, в том числе мужчин –(52%), женщин –(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 100 культур микроорганизмов, изучены их основные биологические свойства. Результаты проведенных бактериологических исследований показали (Рисунок 2), что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной, здоровой роговицей) имел

следующий состав: *S. epidermidis* - 53 (53%), *Streptococcus spp.* - 14 (14%), *S. aureus* - 4 (4 %), *E.coli* – 3 (3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *S. haemolyticus* -3 (3%), *S. pneumoniae* - 2 (2%), бактерии не выявлены– 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%) (Рисунок 2).

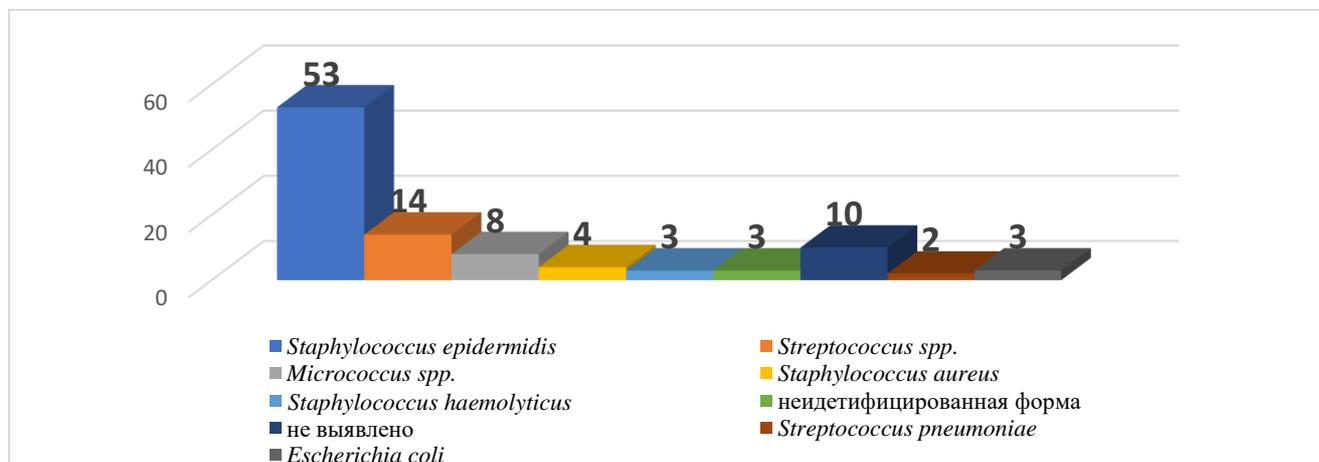


Рисунок 2 - Нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы

У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы (Рисунок 3) было установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими патогенными микроорганизмами, как патогенные штаммы стафилококков, которые способствовали созданию благоприятной почвы для наслоения кандидозной инфекции. Грамположительная флора встречалась в 96%: *S. epidermidis* - 76%; *S. aureus* – 14%; *Streptococcus spp.* – 4%; *Enterococcus spp.* – 2%; грамотрицательная микрофлора: *Enterobacteriaceae spp.* – 2 %. Среди грибов: *Candida spp.* – 2%

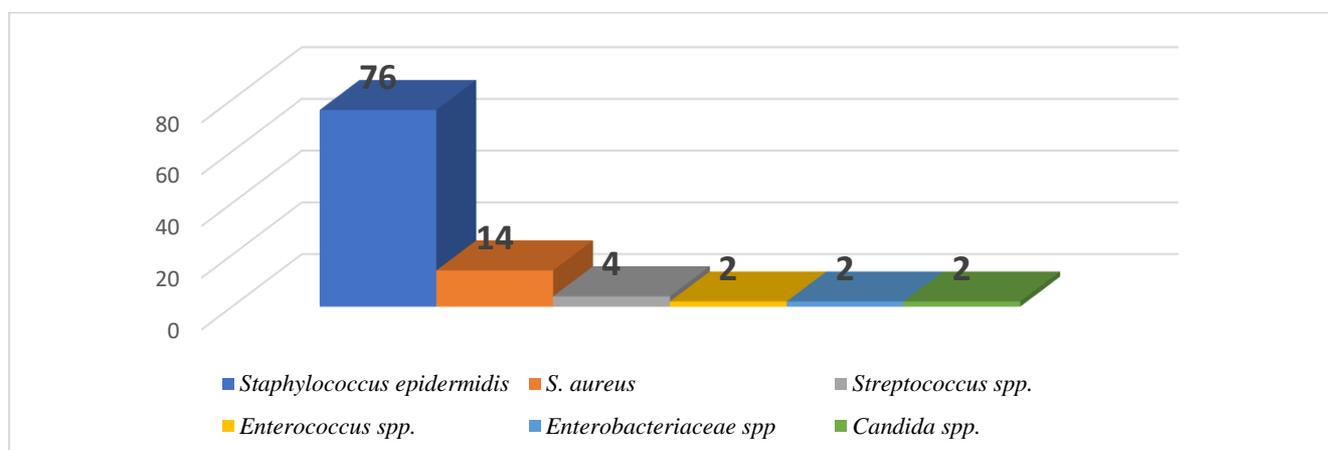


Рисунок 3 - Микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов

## ГЛАВА 3. Разработка антимикробного нисомального геля с пептидами

### 3.1. Технология получения антимикробного нисомального геля с пептидами

Первоначально характеризовали выделенные пептиды. Низкомолекулярные плацентарные пептиды, полученные по оригинальной технологии [5], 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, что говорит о высокой биологической активности, тканеспецифичности и отсутствии видоспецифичности и иммуногенности [8]. Эксклюзионная хроматография показала основной пик, соответствующий преобладающей фракции белков с наибольшей молекулярной массой. Характер сигнала и данные масс-спектрометрии образца свидетельствуют о том, что эта фракция соответствует группе сигналов на масс-спектрах с  $m/z$  около 6000 Da (Рисунок 4, Рисунок 5, Таблица 6).

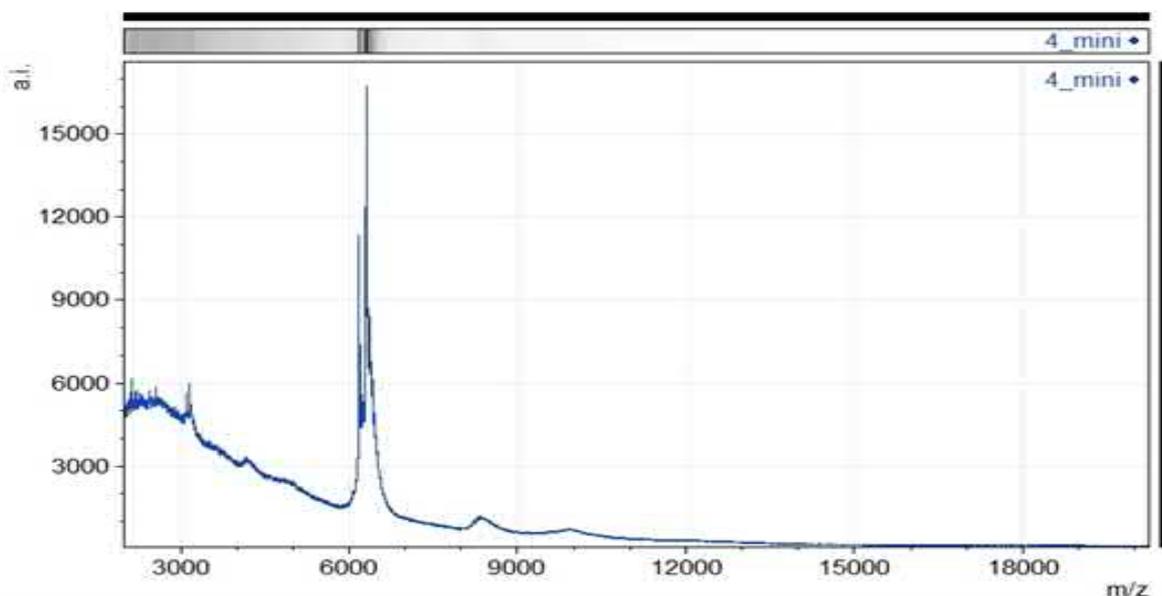


Рисунок 4 - Данные масс-спектрометрического анализа низкомолекулярных плацентарных пептидов

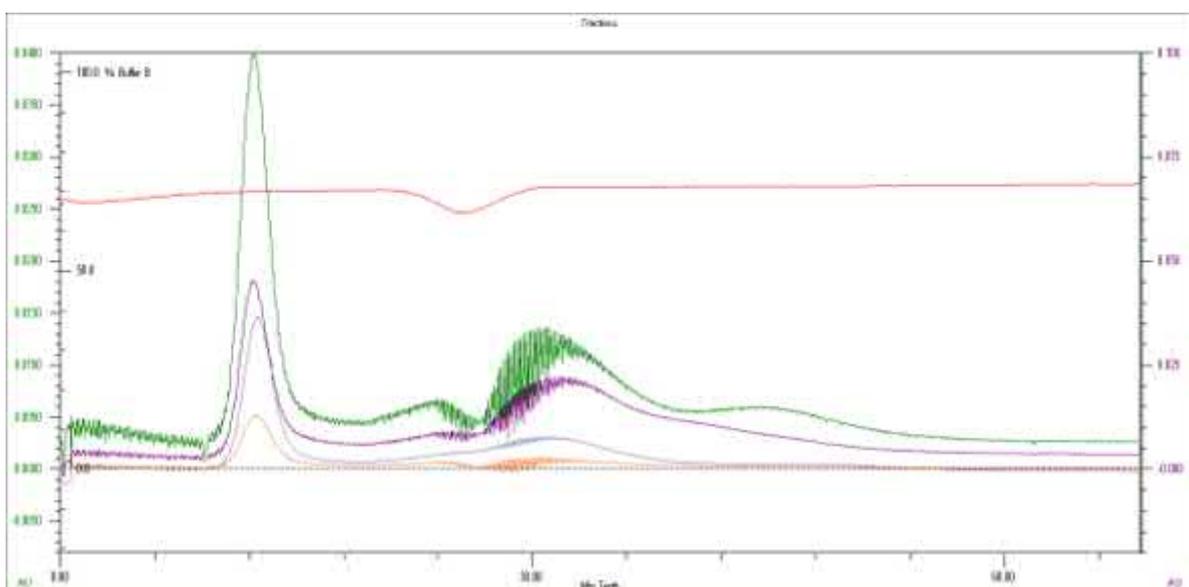


Рисунок 5 - Хроматограмма низкомолекулярных плацентарных пептидов

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

Таблица 6 - 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

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. Общеизвестно, что пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Da представляют собой цитомедины [7].

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 [9, 10, 11, 12, 13].

Выделенные низкомолекулярные плацентарные пептиды стандартизированы по антимикробной эффективности и регенераторной активности. Таким образом, антимикробное и регенерирующее действие низкомолекулярных плацентарных пептидов основано на сигналах межклеточного взаимодействия, что позволяет их использовать для иммунорегуляции, ранозаживления, нейротрофической терапии, и, безусловно, в лечении инфицированных ожогов роговицы [5, 62, 63].

Разработанный в данной работе метод выделения эндогенных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров включал проведение вирусологического контроля крови. Исследовали отсутствие антител к вирусам ВИЧ, гепатитов С и В. 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. 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 гельфильтрации 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 рН 7,4. Применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия). 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) [7, 8].

Выделенные из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы антимикробные эндогенные пептиды представляли собой дефензины-альфа. Калибровочный график концентраций дефензин-альфа представлен на рисунке 6, где по оси абсцисс

указана концентрация, а по оси ординат – площадь пика. Полученную фракцию еще раз стерилизовали фильтрацией через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.

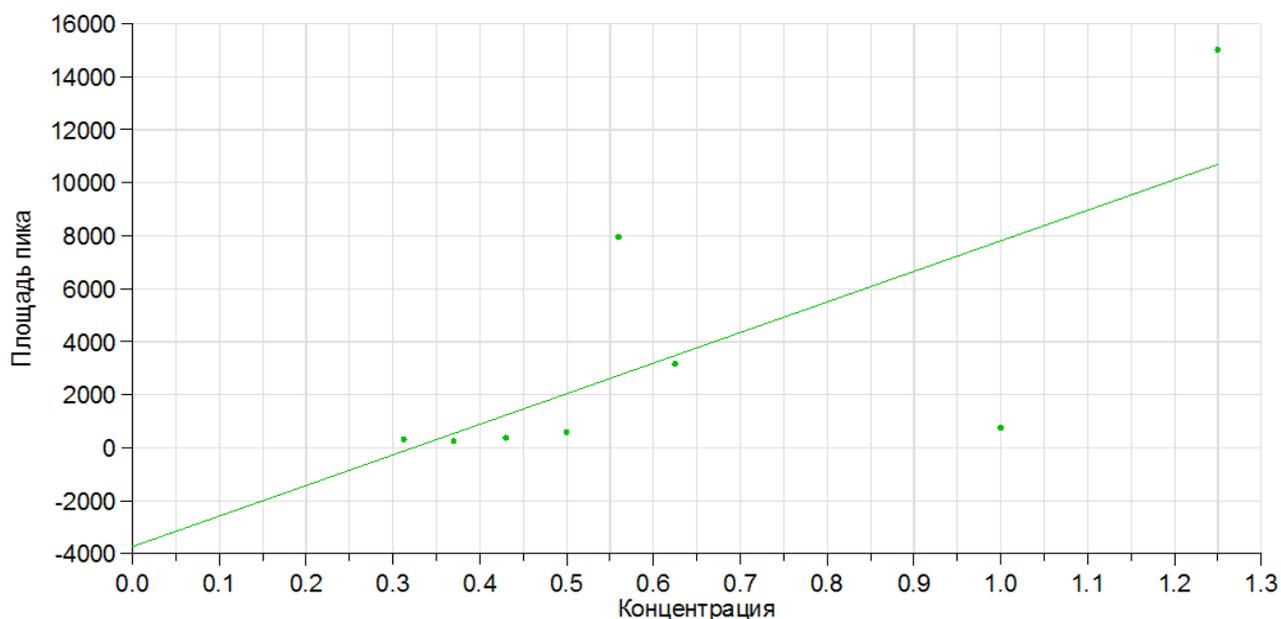


Рисунок 6 - Калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1)

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

На рисунке 7 представлена хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат оптическая плотность (mAU). Помимо дефензина-альфа, выделены и другие виды дефензинов в остаточном количестве, отражённые в таблице 8, 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. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат - оптическая плотность. В таблице 7 отображены данные хроматограммы после промывки регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25 .

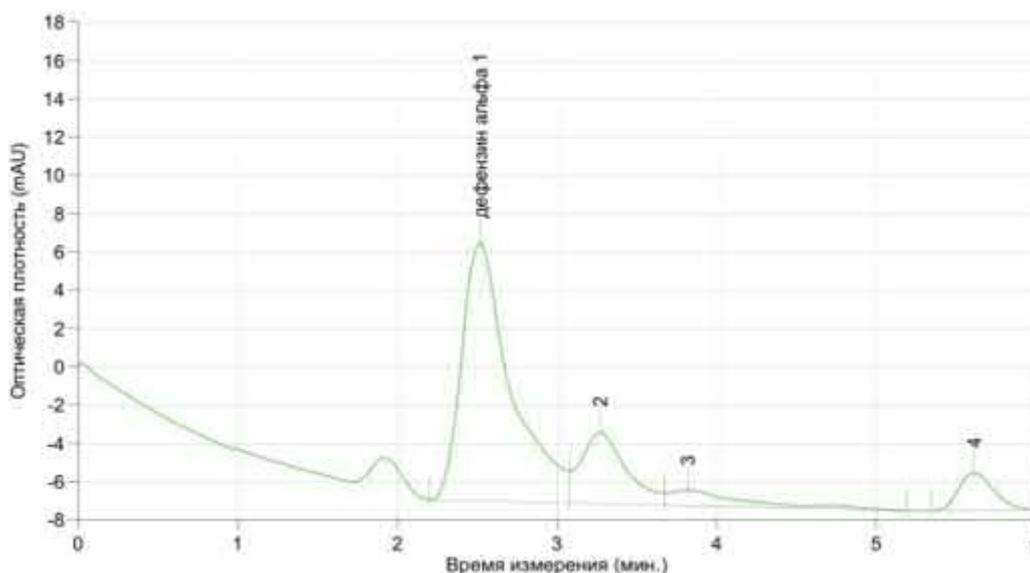


Рисунок 7 - Хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки

*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 7 - 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

Полученные результаты (Рисунок 8, Таблица 8) показали, что оптимизированная технология выделения эндогенных низкомолекулярных пептидов перспективна для дальнейшего создания фармацевтических композиций.

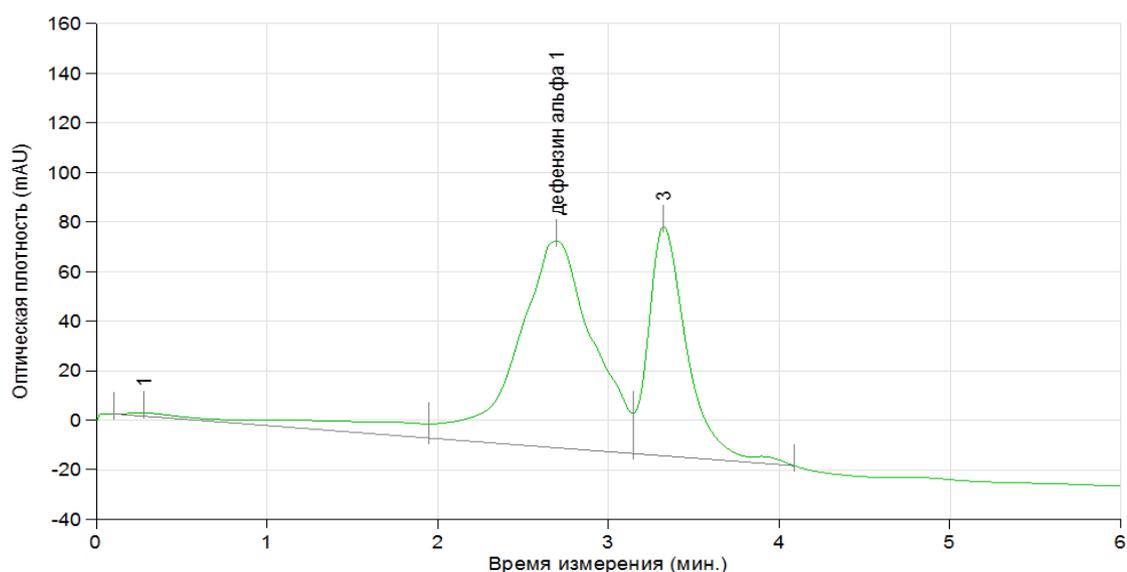


Рисунок 8 - Хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Таблица 8 - 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

В последующем, выделяли более полную фракцию эндогенных низкомолекулярных пептидов, содержащих дефензины-бета с широким комплексом антимикробных пептидов и повышенной биологической ценностью.

Поставленная задача достигалась использованием измельчённой гомогенизированной ткани плаценты животного происхождения, проведением трипсинизации и выделением АМП методом жидкостной хроматографии на разделительной колонке с использованием Сефадекса G-25. При этом низкомолекулярные пептиды проникали внутрь частиц Сефадекса G-25, а высокомолекулярные пептиды проходили мимо, вследствие чего скорость прохождения веществ через колонку с наполнителем различна для пептидов с разной молекулярной массой. Так, высокомолекулярные пептиды фильтровались быстрее, а низкомолекулярные задерживались в

колонке и выходили в составе последней фракции гидролизата, содержащей бета-дефензины.

Использование разделительной колонки позволило получить фракцию с содержанием дефензин- бета 1 -  $77.095 \pm 6,4$  (нг/мл), что увеличило содержание дефензина-бета 1 во фракции более чем в 10 раз по сравнению с прототипом. Определение содержания дефензина-бета в гидролизате плаценты проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Из 10 г исходного сырья плацентарной ткани получали 500 мл фракции с концентрацией 77.095 (нг/мл).

Конструирование геля заключалось в иммобилизации выделенных низкомолекулярных плацентарных и антимикробных эндогенных пептидов в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы, обладающие доказанной высокой проникающей способностью. Данная рецептура позволяет снизить терапевтическую дозу и повысить эффективность за счет увеличения биодоступности препарата и пролонгированности высвобождения. Инкапсулирование выделенных пептидов в кремнийорганические ниосомы, обладающие наноразмером и значительной проникающей способностью, позволяет им беспрепятственно проникать в роговицу и пролонгировать терапевтический эффект. Ниосомы представляют собой мультиламеллярные везикулы размером от 20 до 100 нм (Рисунок 9).



Рисунок 9 - Результаты электронной микроскопии кремнийорганических ниосом на сканирующем зондовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия)

Во внутренний объём ниосом инкапсулировали активную субстанцию – выделенные с помощью жидкостной хроматографии пептиды. Пептиды, обладающие тропностью к ПЭГ-12 диметикону (липидной природы), иммобилизовались в ниосомы при ультразвуковом воздействии. В заключительной стадии использовали гелеобразователь и консервант (Таблица 9).

Таблица 9 - Состав антимикробного ниосомального геля

Состав геля:	
Эндогенные антимикробные и плацентарные пептиды	100 мкг
ПЭГ -12 диметикон	100 мл
Гелеобразователь	50 мл
Консервант	0,04-0,06 г
Вода очищенная	до 1000,0 мл

Отработаны фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами (Таблица 10).

Таблица 10 - Фазы приготовления и рецептура антимикробного ниосомального геля с эндогенными антимикробными и плацентарными пептидам.

	Наименование ингредиента	Содержание в % (по массе)
Фаза А		
Интенсивное механическое встряхивание на шейкере ПЭГ- 12 диметикона		
Фаза Б		
Ультразвуковая обработка дисперсии ниосом		
Фаза В		
Механическое перемешивание всех компонентов в смесителе		
1	Дистиллированная вода	до 100
2	Гелеобразователь	2,5
3	Эмульсия ниосом, содержащая выделенные пептиды	1
4	ПЭГ-12 диметикон	2
Фаза Г		
Эмульгирование геля на АПВ гомогенизаторе		

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

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

Проводили анализ чувствительности нормальной и выделенной у пациентов микрофлоры конъюнктивальной полости к выделенным дефензинам альфа и бета и антибиотик «Цефтаролин» (ACS DOBFAR, S.p.A. (Италия), используемому в качестве контроля.

Для оценки антимикробной активности дефензинов в качестве препарата сравнения использован цефалоспорин 5-го поколения цефтаролин, так, как он обладает бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Бактерицидное действие цефтаролина обусловлено ингибированием биосинтеза клеточной стенки бактерий за счет связывания с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ). Цефтаролин проявляет бактерицидную активность в отношении *S. aureus* ((метициллин-чувствительный и метициллин-резистентный)) за счет высокой аффинности к ПСБ2а [202]. Он используется при инфекциях кожи, слизистых и мягких тканей, вызванных большим количеством грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе: *Staphylococcus aureus* (включая метициллинрезистентные) и *E. coli* [200]. Кроме того, резистентные к цефтаролину изоляты различных видов стафилококков встречаются крайне редко [9].

Для оценки антимикробного действия дефензинов в данном разделе исследований использованы штаммы *S. aureus* (контрольный штамм *S. aureus* ATCC 29213, слабый продуцент бета-лактамаз, штаммы *S. aureus*, выделенные из слезной жидкости от здоровых людей и клинические изоляты *S. aureus*). Выбор стафилококков для оценки антимикробного действия дефензинов был обусловлен тем, что разные

виды стафилококков в подавляющем числе случаев (53 %) выделяются при гнойно-воспалительных офтальмологических осложнениях химических ожогов роговицы в клинической практике.

Несмотря на то, что *E. coli*, по сравнению, например, со стафилококками, значительно реже является этиологическим агентом при офтальмологических инфекциях (около 3 % случаев), для оценки широты антимикробного спектра действия дефензинов в наших исследованиях использован указанный микроорганизм – в качестве представителя грамотрицательных бактерий (контрольный штамм *E. coli* ATCC 25922, штаммы *E. coli*, выделенные из слёзной жидкости от здоровых людей и клинические изоляты *E. coli*, выделенные от больных с химическими ожогами роговицы из офтальмологических отделений в процессе клинических исследований).

Для оценки антимикробной активности дефензинов (чувствительность микроорганизмов к препаратам и минимальные подавляющие концентрации – МПК) использовали методы, рекомендуемые в Клинических рекомендациях (2021) и ISO 20776-2:2021: стандартизованный диско-диффузионный метод и референтный метод микроразведений в бульоне [48].

### **3.2.1 Диско-диффузионный метод**

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

Для количественного определения выросших микроорганизмов применяли систему колониеобразующих единиц – КОЕ/мл (CFU) и lg CFU. Также чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным пептидам определяли методом серийных разведений в агаре. Для приготовления чашек Петри с растворами антибиотиков использовали сухую агаризованную питательную среду которую растворяли и автоклавировали в соответствии с инструкцией изготовителя. После

автоклавирования колбы с питательной средой помещали на водяную баню, где выдерживали до достижения 48-50 °С. После этого в них асептически вносили рабочие растворы антибиотиков (1 часть рабочего раствора антибиотика на 9 частей расплавленного агара) и при необходимости термолабильные питательные добавки. Затем среду тщательно перемешивали и разливали по чашкам Петри; толщина слоя составляла 3-4 мм. Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания. Приготовленные указанным образом чашки Петри использовали немедленно. Для контроля роста использовали чашки Петри без антибиотиков. Конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды составляла 10<sup>4</sup> КОЕ/мл.

Полученную суспензию инокулировали на поверхности агара в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5-8 мм. После засева чашки Петри оставляли при комнатной температуре для подсыхания, затем переворачивали и инкубировали при 37 °С в течение 20 ч. Для контроля качества приготовления суспензий периодически проводили подсчет реальных колониеобразующих единиц путем высева на неселективные питательные среды. Качество метода оценки антибиотикочувствительности являлся высев использованной для инокуляции суспензии на плотную неселективную среду МПА для контроля чистоты культуры. Оценивали антибиотикочувствительность только при подтверждении чистоты культуры. Учет результатов проводили, поместив чашку на темную неотражающую поверхность. За МПК принимали концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцировки нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев использовали лупу. Наличие единственной колонии на чашке с концентрацией на одно разведение выше, чем явная МПК, не учитывали.

На начальных этапах данного исследования был проведён контроль качества используемой в экспериментах питательной среды – агара Мюллера-Хинтон – значения диаметров зон подавления роста тест-штаммов в соответствии с методологией EUCAST (Таблица 11). Дisko-диффузионным методом определяли

чувствительность 2 контрольных штаммов (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923) к цефтаролину (5 мкг/диск).

В таблице 11 и последующих таблицах представлены средние значения показателей после пятикратного повторения каждого эксперимента.

Таблица 11 - Значения допустимых значений диаметров зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с цефтаролином – контроль качества питательной среды (агар Мюллера-Хинтон)

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

Данные, представленные в таблице 11, подтверждают соответствие качества используемого агара Мюллера-Хинтон (АМХ) требованиям, предъявляемым EUCAST. Интерпретация результатов экспериментов позволяет оценить категории для контрольных тест-штаммов как «чувствительные» к цефтаролину.

Интерпретационные таблицы EUCAST [11] содержат «Пограничные значения диаметров зон подавления роста для определения клинических категорий чувствительности бактерий к антибиотикам», где для результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом стафилококков и кишечной палочки к цефтаролину (при содержании цефтаролина 5 мкг/диск) предусмотрены следующие значения оценочных категорий:

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

В соответствии с этими данными оценивали результаты экспериментов, представленные в таблице 12, с точки зрения оценочных категорий чувствительности штаммов к цефтаролину и, косвенно, к дефензинам альфа и бета.

Средние результаты пятикратного повтора экспериментов по определению чувствительности изучаемых штаммов бактерий (значений диаметров зон подавления роста) к цефтаролину и дефензинам-альфа и -бета диско-диффузионным методом представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты определения чувствительности исследуемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* к антимикробным агентам (АМА)

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

Примечания: \* – в соответствии с EUCAST [11]

Из данных таблицы 12 следует, что все изученные штаммы были чувствительны к цефтаролину, однако дефензин-альфа и дефензин-бета в этих экспериментах показали значительно более выраженную активность по отношению к изучаемым штаммам в сравнении с цефтаролином в аналогичных концентрациях.

Используемые в качестве контроля свободные от антимикробных агентов, «пустые» диски, не обладали антибактериальной активностью.

Результаты экспериментов по определению значения диаметров зон подавления роста, представленные в таблице 12, позволяют сделать вывод о значительно более высокой чувствительности тестируемых штаммов (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* изоляты из слёзной жидкости здоровых людей, *E. coli* клинические изоляты, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* изоляты из слёзной жидкости здоровых людей, *S. aureus* клинические изоляты) к дефензину- альфа и дефензину-бета по сравнению с цефалоспорином 5-го поколения – цефтаролином (Рисунок 10).

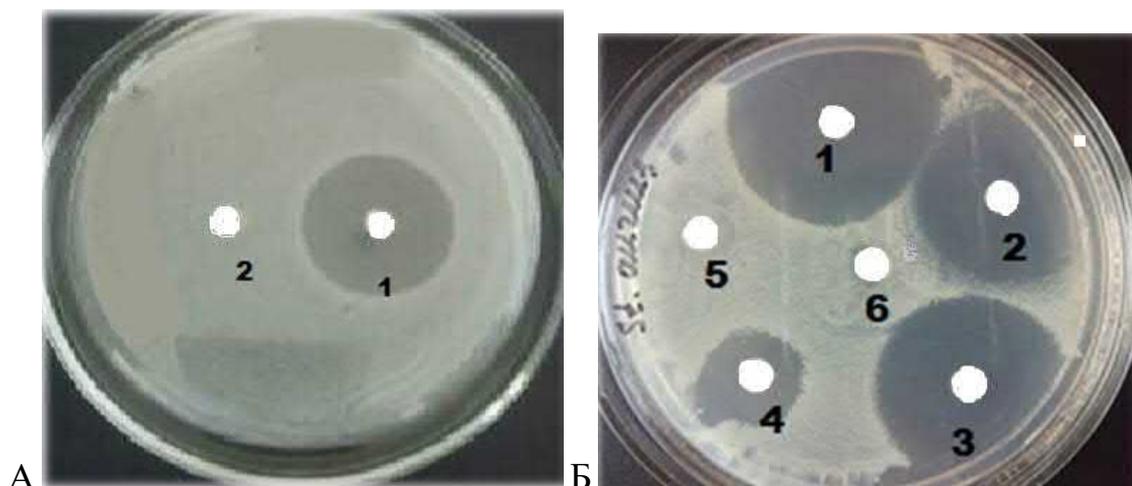


Рисунок 10 - Зоны задержки роста *S. aureus* ATCC 29213 и *E. coli* ATCC 25922

*Примечание:* А: 1-диск с дефензином-альфа (5 мкг/диск), 2 – «пустой» диск без антимикробного агента (контроль) на чашке Петри с газоном *E. coli* ATCC 25922. Б: 1 и 3 – диски с дефензином-бета, 5 мкг/диск; 2-диск с дефензином-альфа, 5 мкг/диск, 5, 6-диски без антимикробных агентов (контроль) на чашке Петри с посевом *S. aureus* ATCC 29213

Результаты этого «качественного» эксперимента легли в основу планирования дизайна последующих «количественных» исследований – определения МПК дефензинов-альфа и бета в сравнении с МПК цефтаролина для исследуемых штаммов микроорганизмов (Рисунок 11). Повышение концентрации дефензинов-альфа и бета до 10 мкг/диск существенно не изменяли антимикробную активность

изучаемых эндогенных дефензинов (Рисунок 12). В связи с чем можно сделать вывод, что применение эндогенных дефензинов в дозе 5 мкг обладает достаточной активностью в отношении клинического штамма *S. aureus*.

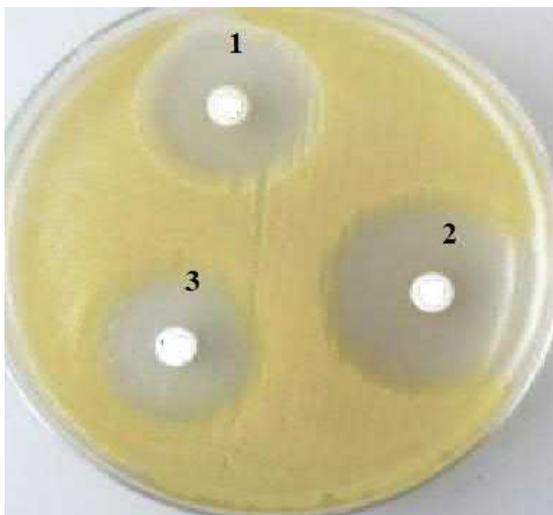


Рисунок 11 – Зоны задержки роста *S. aureus* (клинический штамм)

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



Рисунок 12 – Зоны задержки роста *S. aureus* (клинический штамм)

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

### 3.2.2 Метод микроразведений в бульоне – ММР

МПК – минимальная концентрация антибиотика, подавляющая видимый рост микроорганизма, – основной параметр, характеризующий взаимоотношения между микроорганизмом и антибиотиком.

При посеве по 0,1 мл из разведения  $10^{-6}$  через  $(18 \pm 2)$  ч при температуре инкубации  $(37 \pm 1)$  °C: *E. coli* ATCC 25922 в виде колоний светло-жёлтого цвета диаметром  $(2,0-2,5)$  мм; *S. aureus* ATCC 29213 в виде колоний жёлтого цвета диаметром  $(1,0-1,2)$  мм.

Интерпретационные таблицы EUCAST [11] содержат «Пограничные значения МПК для определения клинических категорий чувствительности бактерий к антибиотикам», где для результатов определения МПК клинических штаммов стафилококков и кишечной палочки к цефтаролину предусмотрены следующие значения оценочных категорий:

- ✓ Стафилококки, МПК: Ч (чувствительные) – меньше или равно ( $\leq$ ) 1 мкг/мл, Р (резистентные) – больше ( $>$ ) 2 мкг/мл;
- ✓ Кишечная палочка, МПК: Ч  $\leq 0,5$  мкг/мл, Р  $> 0,5$  мкг/мл.

В соответствии с этими данными оценивали результаты экспериментов по определению МПК антимикробных агентов с точки зрения оценочных категорий чувствительности тестируемых штаммов к цефтаролину и, косвенно, судили об активности дефензинов-альфа и бета в отношении указанных микроорганизмов в сравнении с цефтаролином (Таблицы 13, 14).

Таблица 13 – Результаты определения МПК цефтаролина для тестируемых штаммов *S. aureus* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация цефтаролина, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1з	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 2з	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1б	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 2б	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таблица 14 - Результаты определения МПК дефензина-альфа для тестируемых штаммов *S. aureus* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация дефензина альфа, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1з	–	–	–	–	–	+	+	–	–	+
<i>S. aureus</i> 2з	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1б	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 2б	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таблица 15 - Результаты определения МПК дефензина-бета для тестируемых штаммов *S. aureus* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация дефензина бета, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1з	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 2з	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 1б	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>S. aureus</i> 2б	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таблица 16 – Результаты определения МПК цефтаролина для тестируемых штаммов *E. coli* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация цефтаролина, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 1з	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>E. coli</i> 2з	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 1б	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 2б	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таблица 17 – Результаты определения МПК дефензина-альфа для тестируемых штаммов *E. coli* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация дефензина альфа, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 1з	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>E. coli</i> 2з	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 1б	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+
<i>E. coli</i> 2б	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таблица 18 – Результаты определения МПК дефензина-бета для тестируемых штаммов *E. coli* методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон

концентрация дефензина бета, мг/л	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	K2	K1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>E. coli</i> 1з	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>E. coli</i> 2з	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>E. coli</i> 1б	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+
<i>E. coli</i> 2б	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+

Примечание: зелёный цвет – нет роста; фиолетовый цвет – наличие видимого роста бактерий

Таким образом, все тестируемые штаммы *S. aureus* и *E. coli* обладали чувствительностью к цефтаролину и дефензинам-альфа и -бета. При этом в аналогичных концентрациях МПК дефензина-альфа и, особенно, дефензина-бета были в 2-4 раза ниже по сравнению с аналогичными показателями для цефтаролина (Таблицы 13, 14, 15, 16, 17, 18).

В таблице 19 представлены сводные результаты определения МПК антимикробных агентов (АМА) – цефтаролина, дефензина-альфа и -бета в отношении изучаемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* с приведением значений оценочной категории «чувствительные» для этих бактерий в соответствии с EUCAST [11] в отношении антибиотика цефтаролина.

Таблица 19 - Сводные результаты определения чувствительности исследуемых штаммов *S. aureus* и *E. coli* к антимикробным агентам (АМА)

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

Примечание: \* – в соответствии с EUCAST [11]

Из данных, приведённых в таблице 19 следует, что все тестируемые штаммы были чувствительны к цефтаролину в соответствии с оценочными категориями EUCAST [11]. Однако МПК дефензинов-альфа и -бета свидетельствуют об их более высокой антибактериальной активности в аналогичных концентрациях по сравнению с таким эффективным антибиотиком как цефалоспорин 5 поколения – цефтаролин.

Эти данные демонстрируют высокую антимикробную активность дефензинов по отношению к клиническим штаммам стафилококков и кишечной палочки, выделенным от людей при различных патологических состояниях.

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

Полученные данные позволили определить потенциально оптимальные концентрации антимикробных пептидов альфа и бета для их последующего инкапсулирования в кремнийорганическое наноконтейнеры (ниосомы) с целью конструирования эффективных лекарственных гелей для экспериментального местного лечения бактериальных осложнений химических ожогов роговицы.

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

На экспериментальных животных проводили изучение безопасности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами. Исследования выполняли согласно утвержденному письменному протоколу, плану доклинических исследований в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП). В основе дизайна исследования использованы методические указания «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012). Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по изучению токсических свойств веществ в остром опыте на лабораторных животных. Исследование было выполнено на базе вивария Ставропольского государственного медицинского университета. После доставки из специализированного питомника животные в течение 2-х недель находились на карантинном режиме в стандартных условиях вивария, с соблюдением всех правил

лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Животные содержались в стандартных условиях вивария с температурой воздуха  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажностью 40–60%. Световой цикл в помещениях был инвертирован для исключения негативного влияния суточных биоритмов на пищевое и питьевое поведение животных.

Для определения параметров острой токсичности исследуемого препарата использовали белых беспородных крыс весом 180–220 г и кроликов весом 2,1–2,3 кг. Каждая из 4 опытная группа крыс массой 180–220 г самцов и самок состояла из 12 животных. Каждая из 4 групп кроликов состояли из 3 животных. Подбор животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%.

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.

В течение 2 недель проводили наблюдение за общим состоянием и поведением животных, а также проявлением симптомов интоксикации. Регистрировали кожно–раздражающее, кожно–резорбтивное и сенсibiliзирующее действие антимикробного ниосомального геля, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, тонуса скелетных мышц, реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоты и глубины дыхательных движений, состояния волосяного и кожного покровов, окраски слизистых оболочек, особенности потребления корма и воды, изменения массы тела. Доклинические исследования на животных являются показателем безопасности разработанных антимикробных соединений.

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 (Таблица 20).

Таблица 20 - Определение острой токсичности антимикробного ниосомального геля с выделенными пептидами при нанесении на кожу у крыс и кроликов

Показатель	Крысы				Кролики			
	0,08	0,2	0,8	2	0,08	0,2	0,8	2
Исследуемые дозы (мг/кг)	0,08	0,2	0,8	2	0,08	0,2	0,8	2
Количество животных в группе	12	12	12	12	3	3	3	3
Выжило	12	12	12	12	3	3	3	3
Погибло	0	0	0	0	0	0	0	0

## **ГЛАВА 4. Эффективность антимикробного ниосомального геля с пептидами у экспериментальных животных при инфицированном химическом ожоге роговицы**

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

В регуляции процессов заживления инфицированных химических ожогов роговицы основную роль отводят цитокинам, влияющим на межклеточные взаимодействия [38,46]. В начальных фазах воспаления происходит увеличение количества провоспалительных цитокинов (хемокинов, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, фибринопептидов, кининов и др.). Это имеет патологический характер, если их активация сохраняется в течение всего заболевания [55]. Химический ожог обуславливает гипериндукцию цитокиновой системы в организме. Гиперергические клеточные реакции сопровождаются выделением большого количества разных цитокинов [1,7].

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.

Развитие ожоговой раны в группе контроля (с инфицированным щелочным ожогом, без лечения) обуславливает повышение уровня провоспалительных цитокинов. Количество IL-1 $\beta$  увеличивалось на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней. В сравнении с интактными животными на 3 сутки количество цитокинов IL-1 $\beta$  было повышено на 27 %, на 7 – на 62 %, на 14 – на 120 %, на 21 – на 180 %, на 28 – на 250 %.

на 21 – на 43 %. Уровень TNF- $\alpha$  был выше в течение всего периода эксперимента. Исследование показало, что на 3 и 7 сутки уровень TNF- $\alpha$  вырастал в целом в 2 раза в сравнении с интактными животными. Затем к 21 дню эксперимента уровень TNF- $\alpha$  снижался, но был выше, чем у интактных животных. Через 2 недели уровень TNF- $\alpha$  повышался на 70 %, на 21 сутки – на 40 %, на 28 сутки – на 34 % в сравнении с уровнем TNF- $\alpha$  интактных кроликов. Исследование уровня IL-8 показало его повышение в течение всего времени исследования в сравнении с интактными кроликами. Содержание IL-8 увеличивалось на 19 % на 3 сутки, и на 33 % на 7 сутки в сравнении с интактными кроликами. Через 2 недели уровень IL-8 и IL-1 $\beta$ , был максимальным до окончания эксперимента, в целом выше нормы в 1,5 раза. Через 3 и 4 недели содержание IL-8 было выше, чем у интактных кроликов, что превышало аналогичный показатель животных на 37 % и 30% соответственно. Такой уровень цитокинов обуславливал персистирующее воспаление без лечения и препятствовал нормальному заживлению раны с инфицированным химическим ожогом. У лабораторных животных с инфицированным щелочным ожогом, которым наносили ниосомальный антимикробный гель с пептидами, течение раневого инфицированного процесса было более благоприятным, чем в группе контроля. В сравнении с предыдущей группой эпителизация раневого дефекта и уменьшение зоны некроза происходили быстрее. Эти процессы были очевидными на протяжении двух недель наблюдения (до 21 суток). Через три недели (к 28 суткам) ожоговая рана полностью эпителизовалась, на месте дефекта образовался нежный рубец.

Лечение животных антимикробным ниосомальным гелем с пептидами сопровождалось снижением всех исследованных цитокинов, в сравнении с самопроизвольным развитием инфицированного химического ожога. Концентрация цитокина IL-1 $\beta$  была более высокой по сравнению с интактными животными. Этот процесс был зафиксирован в течение первой недели эксперимента. Так, показатели цитокина IL-1 $\beta$  на 3 сутки были на 30 %, а на 7 сутки – на 37 % выше, чем в первой группе. Через 2 недели уровень этих цитокинов достигал значений нормы и снижался в 2,5 раза, в сравнении с животными из группы с ожогами без применения лекарственных средств. Через 3 недели уровень IL-1 $\beta$  снижался в 1,2 раза в

сравнении с аналогичными показателями у животных с ожогами, но без лечения. Уровень цитокинов TNF- $\alpha$  в начальные сроки эксперимента на 3–14 сутки был выше, чем аналогичные показатели у интактных животных. Так, количество TNF- $\alpha$  превышало значения интактных кроликов на 3 сутки – в 1,4 раза, на 7 сутки – в 1,2 раза, на 14 сутки – в 1,2 раза. Причём эти данные были достоверно ниже показателей слёзной жидкости животных из группы с ожогом без лечения. Через 3-4 недели количество TNF- $\alpha$  снижалось до уровня нормы. Концентрация IL-8 в крови понижалась к норме со 2 недели до конца эксперимента. Уровень IL-8 в слезной жидкости животных до конца 4 недели эксперимента снижался в сравнении с показателями животных с ожогами без лечения. Так, через неделю было зафиксировано снижение IL-8 – в 1,1 раз, через 2 и 3 недели – в 1,4 раза и через 4 недели – в 1,3 раза.

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 сокращает период цитокиновой активности при нормализации концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, а TNF- $\alpha$  – на 21 сутки. Это сопровождается 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 происходит повреждение тканей глаза. Это стимулирует выработку ИЛ-1, так как этот цитокин является регулятором воспаления в организме. Понижение концентрации ФНО- $\alpha$  в слёзной жидкости животных с ожоговым поражением глаза

объясняется тем, что наступает повреждение кератоцитов, являющихся их продуцентами.

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

Первоначально была создана 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  $10^5$ - $10^6$  Мк/мл. Для заражения язвенной поверхности роговицы использовали 1 мл культуры. В первой контрольной группе животным проводили лечение 1% тетрациклиновой мазью в течение всего периода наблюдения. Другие животные из второй контрольной группы не получали никакого лечения. Для выведения кроликов из эксперимента в определённые планом исследования сроки проводили декапитацию. Энуклеацию осуществляли на 1, 3, 7, 10 и 30 сутки.

Для гистологической оценки глаз животных использовали общепринятые методы. Энклеированные 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. Оценка динамики эпителизации и площади дефекта эпителия роговицы проводилась ежедневно. Для этих целей использовалось фокальное освещение и фоторегистрация с помощью цифровой фотокамеры «Nicon», (Япония). Эффективность лечения разработанным антимикробным гелем оценивали по срокам исчезновения микрофлоры и динамике регенерации повреждённой при ожоге роговичной ткани. Использовались также такие клинические параметры, как: снижение воспалительной реакции и гнойного отделяемого, интенсивности эпителизации роговицы, новообразования сосудов. Оценку физического состояния животных, их неврологического статуса, поведенческих реакций проводили в течение всего эксперимента.

До начала эксперимента гистологическая оценка показала, что роговица глаза кролика покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием. Эпителий расположен на базальной мембране. Собственная оболочка роговицы представлена гомогенными соединительнотканными пластинами (Рисунок 13А).

Морфологическое определение признаков токсического действия продуктов распада поврежденных клеток показало, что через 3 суток от начала эксперимента эпителиальные клетки роговицы были увеличены в размерах, они набухали и приобретали округлую форму. Этот процесс сопровождался появлением в эпителиальных клетках эозинофильной зернистости и мелких вакуолей (Рисунок 13Б). В собственной оболочке роговицы появляются участки небольшого отека, отмечается расслоение коллагеновых волокон, набухание основного вещества

соединительной ткани. Между коллагеновыми волокнами появляются мелкоочаговые воспалительные инфильтраты из лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов (Рисунок 13В). В краевой зоне роговицы наблюдается отек, полнокровие сосудов, стазы (Рисунок 13Г).

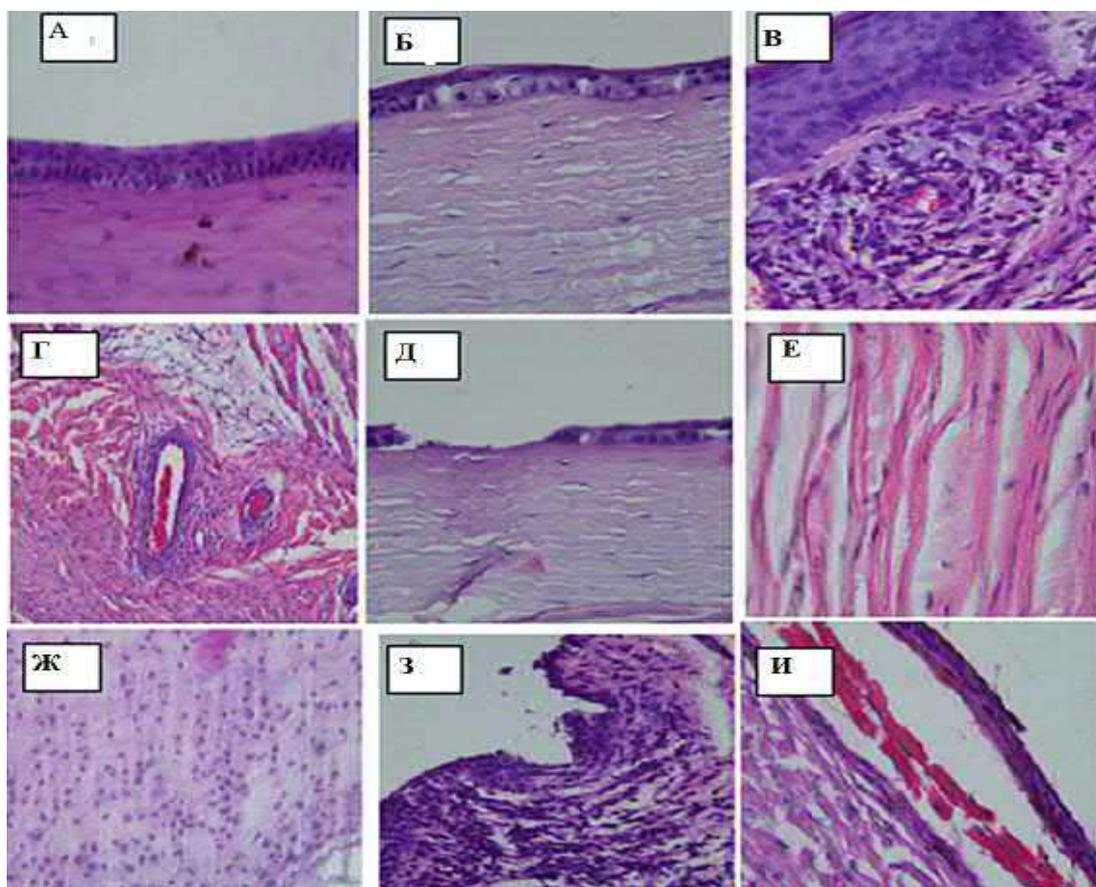


Рисунок 13 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога до лечения антимикробным ниосомальным гелем

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

На пятый день эксперимента эпителий роговицы характеризовался гидропической и баллонной дистрофией. На всём протяжении эпителиального пласта был отмечен некроз и десквамация с образованием эрозий (Рисунок 13Д). Эндотелий роговицы местами десквамирован, в сохранившихся эндотелиальных клетках отмечаются дистрофические изменения. В эти же сроки в собственной оболочке роговицы наблюдалось набухание эндотелия, сопровождающееся диффузным отёком (Рисунок 13Е). Отмечалось пропитывание коллагеновых волокон отёчной

жидкостью. Они были набухшими и склеенными между собой. Воспалительная инфильтрация нарастала и сопровождалась преобладанием полиморфноклеточных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов (Рисунок 13Ж). Длительно существующий воспалительный процесс препятствовал формированию прочных стромально-эпителиальных взаимоотношений и, как следствие, полной эпителизации ожоговой роговицы.

Через 7 суток после химического ожога у интактных животных наблюдалось усиление дистрофических и деструктивных изменений. Этот процесс сопровождался интенсивным некрозом эпителия и образованием крупных эрозий на значительном протяжении. На дне эрозий в эпителии роговицы отмечалось увеличение воспалительной инфильтрации (Рисунок 13З). За счёт отека происходило поднятие и отслоение многослойного плоского эпителия роговицы. Под эпителием накапливалась отечная жидкость (Рисунок 13И). В эндотелии роговицы наблюдались выраженные дистрофические и деструктивные изменения, десквамированные на значительном протяжении. В ткани выявлено увеличение отёчности и воспалительной инфильтрации. Преобладающее большинство эмигрирующих лейкоцитов составили нейтрофилы. Помимо них, наблюдались лимфоциты, моноциты, базофильные гранулоциты и эозинофилы. Данные клетки продвигались в зону повреждения роговицы между волокнистыми структурами по направлению к центру воспаления, где и наблюдалось их наибольшее скопление. Коллагеновые волокна были пропитаны отечной жидкостью, набухшие, с участками деструкции и фрагментации волокон, также обнаружены участки кератомалиции. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что щелочное повреждение роговицы экспериментальных животных (кроликов) 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 эпителиальной выстилке

отмечалось сохранение упорядоченности слоев. В собственной оболочке были обнаружены единичные клетки с признаками гидропической дистрофии. В эпителии роговицы по сравнению с интактными животными наблюдалось уменьшение отека. В данный период лечения в оболочке роговицы было отмечено снижение количества очаговых инфильтратов. В инфильтратах обнаруживались лимфоциты, плазматические клетки и немного нейтрофилов (Рисунок 14А). На 5-е сутки лечения кератита антимикробным ниосомальным гелем патологические изменения в роговице были купированы. Многослойный плоский эпителий роговицы был восстановлен на всем протяжении (Рисунок 14Б). Отмечалась полная регенерация эндотелия роговицы. Базальные мембраны роговицы были целыми. Собственная оболочка роговицы приобретала нормальную гистологическую структуру. По сравнению с интактной группой при лечении химического ожога антимикробным ниосомальным гелем с пептидами воспалительные инфильтраты были мелкими, располагались преимущественно в субэпителиальных зонах (Рисунок 14В). В данный период лечения в инфильтрате роговицы преобладали лимфоциты. Отек собственной оболочки значительно уменьшился, отмечалось набухание коллагеновых волокон, но очаги деструкции не обнаружены (Рисунок 14Г). Площадь стромальных дефектов в опытной группе на протяжении всего срока наблюдения была значительно ниже размеров дефектов в контрольной группе. На 7-е сутки лечения химического ожога роговицы антимикробным ниосомальным гелем в роговице глаза кролика наблюдалось врастание сосудов в роговицу при воспалительном процессе, что способствовало купированию отека и экссудативной реакции (Рисунок 14Д). Вращание сосудов и нервов после повреждения, в том числе, и после ожогов, имело значительное влияние на процессы восстановления и дифференцировки эпителиальной и соединительной ткани роговицы. Вращание нервных волокон в регенерат обеспечивало нервную связь регенерата с организмом, а это означало обеспечение трофической и функциональной регуляции восстановительных процессов. Учитывая присущее низкомолекулярным пептидам экстракта плаценты нейротрофическое действие, а также интенсивность течения репаративных процессов в опытной группе, мы предполагаем, что применение антимикробного ниосомального геля с

пептидами способствует также стимуляции реиннервации в ожоговой роговице. Так, в нашем эксперименте наблюдалось восстановление структурной целостности эпителия роговицы (Рисунок 14Е). В опытной группе, в отличие от контрольной, к концу эксперимента отмечено восстановление прочных эпителиально-стромальных взаимоотношений, обусловленных формированием нормальной архитектуры волокнистых компонентов межклеточного вещества.

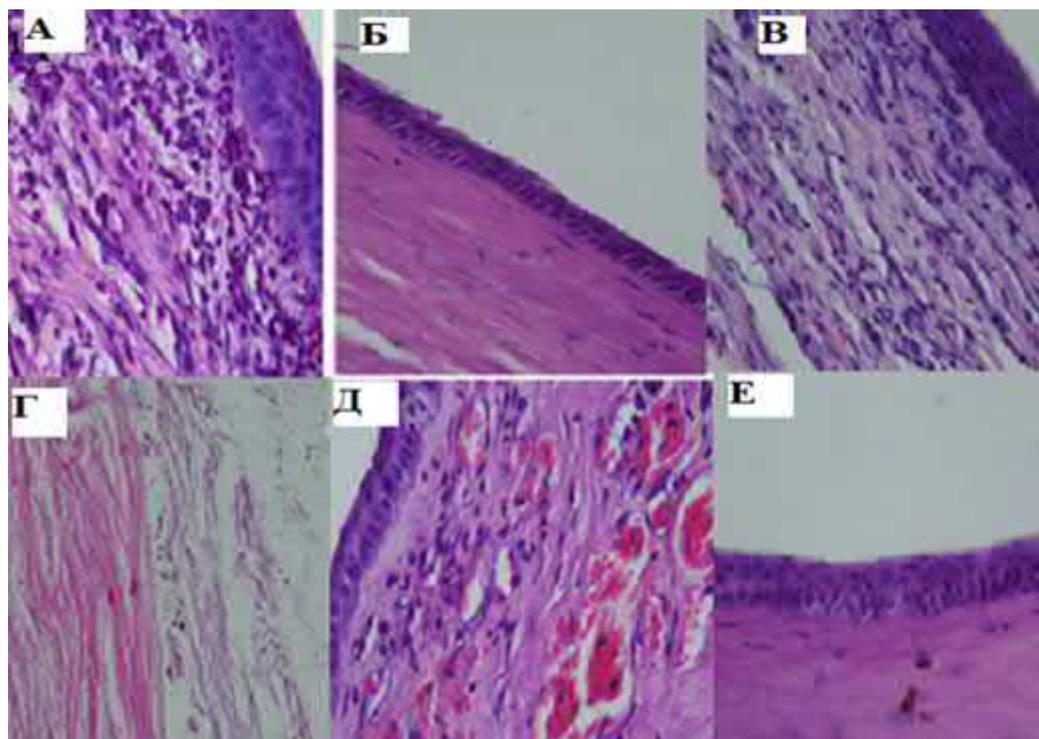


Рисунок 14 - Гистологические изменения роговицы после химического ожога при лечении антимикробным ниосомальным гелем

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

Таким образом, в ходе проведенного экспериментального исследования показано, что химический ожог приводил к изменениям собственной оболочки роговицы. В тканях имели место деструктивные и воспалительные процессы. Дистрофические изменения эпителия и эндотелии сопровождалась процессами гидропической и баллонной дистрофии, развивался некроз эпителиоцитов и эндотелиоцитов. В тканях наблюдалась десквамация, изъязвление, приводящее к образованию эрозий. Воспалительные процессы характеризовались появлением отёка и

воспалительной инфильтрации. В первые 3-е суток появлялся серозный кератит, переходящий затем на 5-е сутки в гнойный. К 7-м суткам в собственной оболочке роговицы наблюдались очаги кератомалиции, сопровождающиеся набуханием, деструкцией и распадом коллагеновых волокон. На этом фоне происходила отслойка эпителиального пласта и его десквамация. Дистрофические изменения приводили также к эрозированию собственной оболочки роговицы. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами приводило к оптимизации процессов эпителизации раневой зоны, стимуляции митотической активности базальных и шиповатых клеток переднего эпителия, лимитированию апоптотической доминанты эпителиоцитов и фибробластов собственного вещества роговицы. Воспалительные инфильтраты и отёк уменьшались, восстанавливалась целостность эпителиального пласта и эндотелия. Восстановление гистологической структуры сопровождалось снижением деструктивных изменений в тканях органа. 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.

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

Щелочной ожог сопровождался признаками роговичного синдрома: блефароспазмом, светобоязнью, слезотечением. Наблюдалась перилимбальная ишемия (побледнение) (Рисунок 15А). Согласно литературным данным, степень перилимбальной ишемии является важным прогностическим показателем восстановления роговицы в будущем, поскольку лимбальные ростковые клетки отвечают за возобновление роговичного эпителия. Выраженная ишемия означает неблагоприятный прогноз. Гидроксид натрия приводил к формированию эрозии роговицы в виде круга диаметром до 8 мм, что сопровождалось признаками реактивного воспаления: отеком и инъекцией конъюнктивы. В зоне роговицы, отмечали гибель и десквамацию клеток переднего слоя эпителия роговицы, фрагментацию и исчезновение клеток стромы.

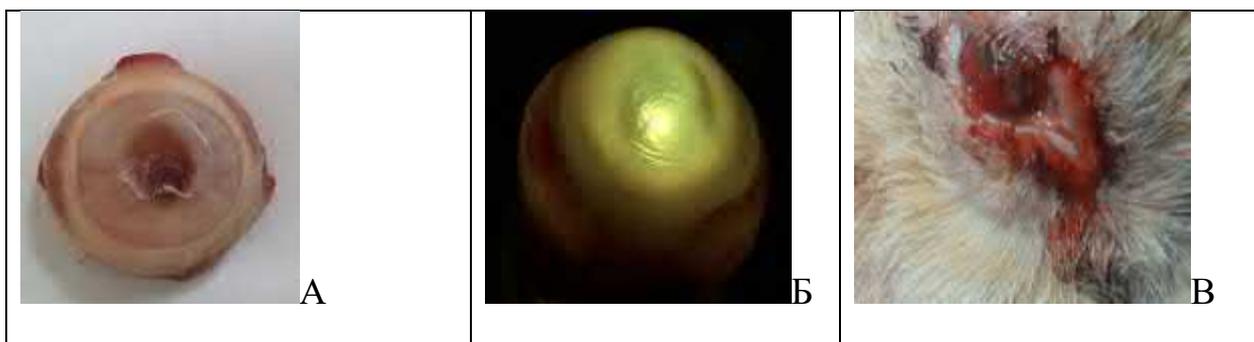


Рисунок 15 - Химический ожог глаз

*Примечание:* А - помутнение роговицы, Б, В - рубцевание посттравматического дефекта

Исследование конъюнктивы показало, что ток крови замедлялся, в мелких сосудах формировались тромбы, плазма выходила в окружающие ткани, что сопровождалось отеком конъюнктивы. В более поздние сроки эксперимента наблюдалось стромальное помутнение. В эксперименте наблюдались изменения характерные для 4 бальной степени помутнения роговицы (выраженное помутнение роговицы, захватывающее оптическую зону и занимающее поверхность с выраженными сосудами) (Рисунок 15Б). Это встречается в случае тяжелого повреждения, когда способность к заживлению роговицы снижена. Повреждение роговицы экспериментальных животных приводило к развитию некротического воспаления. Исход альтернативного воспаления зависел от глубины поражения и повреждения тканей глаза (по срокам наблюдений) и, как правило, заканчивался рубцеванием посттравматического дефекта (Рисунок 15В). Согласно литературным данным воспалительная реакция переднего отдела глаза обычно более выражена при повреждении щелочами в связи со способностью их проникать вглубь [235]. Щелочи растворяют белок и вызывают колликвационный некроз без четко отграниченной зоны поражения. Образующийся при этом щелочной альбуминат не препятствует проникновению токсических метаболитов вглубь тканей. Это приводит к нарушению функции чувствительных и трофических нервов и к глубокой некротизации тканей.

Применение 1% тетрациклиновой мази ускоряло и стимулировало регенерацию (восстановление) поврежденной роговицы и конъюнктивы при химическом ожоге на 10 день эксперимента.

Нанесение ниосомального геля с пептидами на ожоговую поверхность 1 раз в сутки в течение 10 дней способствовало эпителизации раневого дефекта у всех животных опытной группы к 4 суткам. В области воздействия щелочи отмечали нежное поверхностное помутнение (незначительное полупрозрачное помутнение роговицы, охватывающее часть оптической зоны, врастание сосудов от зоны лимба до 2 - 3 мм).

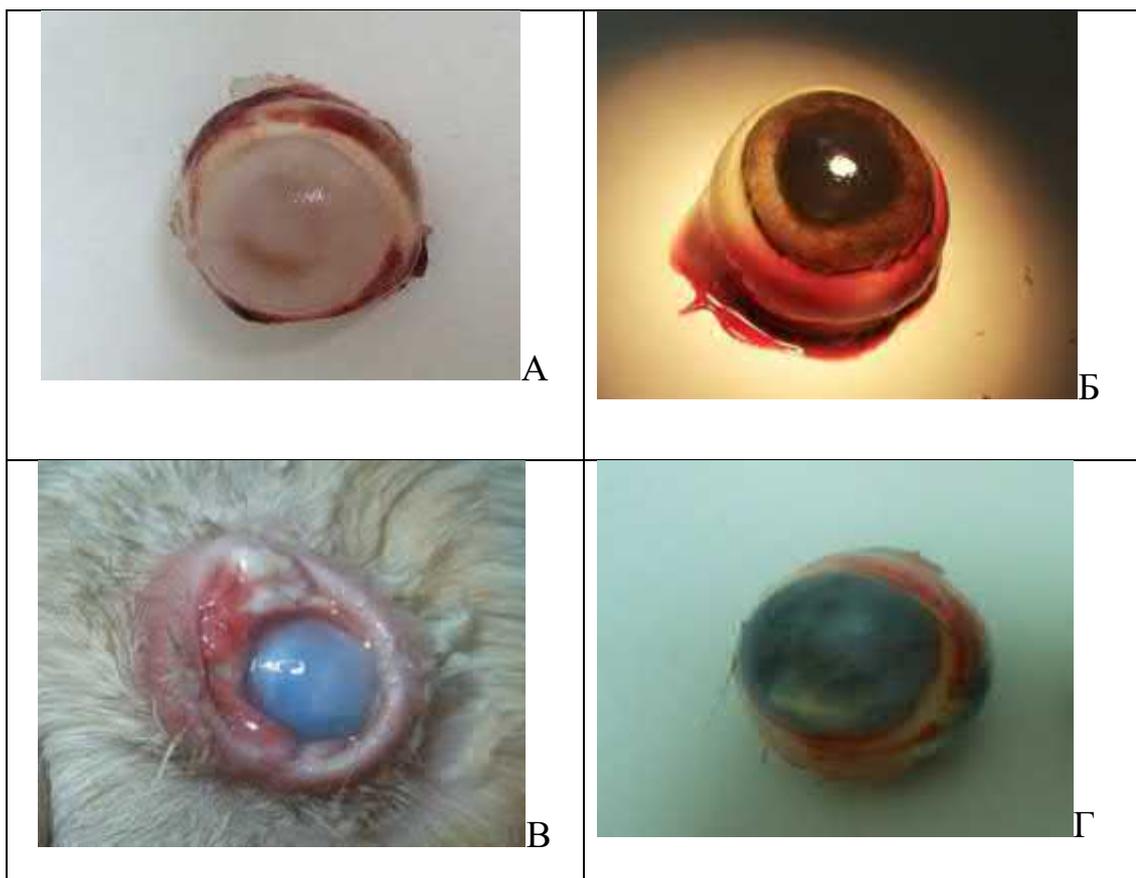


Рисунок 16 - Лечение инфицированного химического ожога ниосомальным гелем с пептидами  
*Примечание:* А - снижение перилимбальной ишемии, Б - восстановление дефектов эпителия роговицы, В - снижение стромального помутнения, Г- снижение воспалительной реакции переднего отдела глаза

В то время, как в контрольной группе дефект сохранялся до 10 суток. Так же было отмечено, что признаки асептического воспаления в опытной группе проходили на трое суток раньше, чем в контрольной группе. В эксперименте также наблюдалось более эффективное снижение перилимбальной ишемии (Рисунок 16А), активнее восстанавливались дефекты эпителия роговицы (Рисунок 16Б),

практически полностью снижались воспалительные реакции переднего отдела глаза (Рисунок 16В, Г).

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

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

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антибиотикорезистентность является глобальным вызовом человечеству. Поливалентная устойчивость микроорганизмов к традиционно применяемым анти-микробным препаратам в подавляющем числе случаев приводит к инфицированию в офтальмопатологии. При химических ожогах это потеря зрения той или иной степени, а в 8-9% случаев - анатомическая гибель глаза [37]. В нормальных условиях, без патологии, веки и конъюнктивы создают условия для персистенции популяции микроорганизмов, не вызывающих инфекционные заболевания. В результате травмы или ожога, при нарушении целостности оболочек глаза, происходит контаминация внутренних структур условно-патогенными бактериями, что приводит к развитию патологического процесса. В неблагоприятных условиях при ослаблении защитных сил макроорганизма, травматизации тканей глаза и экзогенной инфекции эти микроорганизмы образуют токсические вещества, что и становится причиной возникновения инфекционного процесса [56, 101]. Состав нормальной микрофлоры глазного яблока по данным разных авторов довольно вариабелен [109]. Ранними исследованиями установлено, что для нормальной микрофлоры здоровой конъюнктивы наиболее характерны коагулазопозитивные стафилококки (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. intermedius*, *S. wamari*, *S. lugdunensis*, *S. aureus*) и аэробные коринебактерии [84]. Более поздними исследованиями учёными выяснено, что нормальная микрофлора конъюнктивальной полости более разнообразна. Исследователями были выделены дифтероиды, белый и золотистый стафилококк, грамотрицательные бактерии, негемолитические стрептококки, микрококки [218]. По другим данным, микрофлора, в основном, представлена монокультурой и, значительно реже, имеет смешанный характер [84, 85]. В тоже время у определённой части здоровых людей результаты бактериологических исследований микрофлоры из конъюнктивы дали отрицательные результаты [13]. С другой стороны, Воронцова Т.Н. с соавт. (2010) выявляли микрофлору в 63,8% случаев, даже при отсутствии клинических симптомов воспаления переднего отдела глазного яблока [18].

Результаты проведенных бактериологических исследований в нашей работе показали, что нормальный микробиоценоз конъюнктивальной полости и роговицы у пациентов контрольной группы (с интактной, здоровой роговицей) имел следующий состав: коагулазопозитивные стафилококки, в основном *S. epidermidis* – 53 (53%), *S. aureus* - 4 (4 %), *E. coli* – 3(3%), *Micrococcus spp.* - 8 (8%), *Streptococcus spp.* -3 (3%), *S. pneumoniae* - 2 (2%), стерильная конъюнктивальная полость – 10 (10%), неидентифицированная форма – 3 (3%). Структура частоты распространения этиологических факторов инфекционного воспаления располагалась в следующем порядке: *Staphylococcus spp.* - 53%, *S. pneumoniae* - 8%, *Enterobacteriaceae spp.* - 10%, *Pseudomonas spp.* - 3%, грибы - 13%, простейшие - 2%. У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы патогенные штаммы стафилококков, как сопутствующая микрофлора, способствовала созданию благоприятной почвы для наслоения кандидозной инфекции. При инфицированном химическом ожоге роговицы было установлено изменение содержания нормальной микрофлоры конъюнктивальной полости и роговицы глаза такими патогенными микроорганизмами, как гемолитический стафилококк, стрептококк, пневмококк, синегнойная палочка, грибы (*Aspergillus spp.*, *Candida spp.*), дерматомицеты. Грамположительная флора встречалась в 98%, грамотрицательная - в 1,9% и грибы - 0,1%. Среди грамположительных кокков: коагулазонегативные стафилококки - 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% (по зарубежным данным 6,8 до 10,1%). Она была представлена семействами *Enterobacteriaceae spp.* (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *S. marcescens*, *P. rettgeri*, *M. morgani*) и неферментирующими бактериями (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*).

Высокая вариабельность микробных возбудителей конъюнктивы, повышение роли оппортунистической, условно-патогенной микрофлоры и появление антибиотикорезистентной микрофлоры неминуемо приводит к инфицированию ожогов. Играет роль также загрязнение окружающей среды, бесконтрольное применением лекарственных препаратов, иммунодепрессантов. Всё это является причиной

снижения защитных механизмов гуморального и местного иммунитета, что также неминуемо приводит к развитию инфекционных осложнений ожогов глаз [56]. На фоне растущей антибиотикорезистентности очевидна проблема поиска альтернативы традиционным антибиотикам. Эндогенные антимикробные пептиды не вызывают резистентность бактерий или образование биопленки из-за их ионной структуры [179, 183, 211]. Разработка и изучение новых антимикробных средств на их основе в современных условиях приобретает очевидную необходимость.

Ниосомы, как нановекторы, представляют двухслойную структуру, сходную с липосомами, и могут доставлять терапевтические агенты в различные биологические ткани, а также взаимодействовать с биологическими мембранами [131]. В частности, ниосомы, которые являются однослойными или многослойными неионными везикулами поверхностно-активных веществ, могут быть использованы в качестве терапевтических и нанопереносчиков [11, 12]. Для повышения эффективности лечения в медицине, направленной доставки, пролонгации действия лекарственных молекул и снижения их токсичности приобретают значение разработка и использование таких наноконтейнеров, как ниосомы. В настоящее время получены ниосомы кремнийорганической природы, повышающие эффективность терапии в различных областях практического здравоохранения [7, 8, 10, 66]. Ниосомы представляют собой стабильные неионные микроскопические везикулы, состоящие из одной или нескольких мембран различных структур [216]. Широкое применение неионогенных ПАВ при конструировании таких систем обусловлено их биосовместимостью и способностью к биodeградации. Характерные отличительные признаки кремнийорганических ниосом позволяют увеличить биодоступность лекарственных препаратов за счет увеличения проникновения через биологическую мембрану и избирательного накопления на месте патологического очага. Дискаева с соавт. (2018, 2019) [28, 29, 30], исследуя физико-химические параметры кремнийорганических ниосом, выявила их большое преимущество для плохо растворимых лекарств. По мнению авторов, ниосомы увеличивали растворимость лекарства, контролируя высвобождение и продлевая его активность в течение определенного периода времени [28]. Анализ влияния нагрева ниосомальной дисперсии

на средний размер частиц выявлял тенденцию к уменьшению диаметра ниосом с повышением температуры. Ниосомы, подвергнутые термической обработке, становились более стабильными во времени и сохраняли средний размер частиц около 100 нм. Этот подход был рекомендован для дальнейшего совершенствования методов приготовления и хранения стабильных лекарственных форм [29]. Представляют интерес исследования взаимодействия ниосом и клеточной стенки микроорганизмов. Учёные установили, что модификация рН может влиять на супрамолекулярную структуру и морфологию ниосом. По данным авторов [216], при нейтральном и кислотном рН, ниосомы проявляют различные физико-химические свойства. Выявлена зависимость от соотношения поверхностно-активных веществ и липидов, необходимых для самоорганизации ниосом, что играет роль в их структуре и стабильности. Ниосомы, содержащие рН-чувствительные компоненты, при пониженном рН, демонстрировали дестабилизацию бислоя-носителя. Этот подход может быть полезен для преодоления проблем, связанных с механизмами резистентности бактерий к лекарственным средствам. Глубокие исследования физико-химических особенностей ниосом и прогнозирование потенциального расположения двухслойной структуры, реагирующей на специфические внешние раздражители, может быть важным инструментом для понимания потенциального взаимодействия между ниосомами и биологическими мембранами микроорганизмов *in vivo* [143].

Полученные ранее по оригинальной технологии низкомолекулярные плацентарные пептиды [5] и выделенные вышеуказанным способом эндогенные антимикробные пептиды инкапсулировали в наноконтейнеры- кремнийорганические ниосомы. Иммобилизация пептидов в кремнийорганические ниосомы позволила получить гель, обеспечивающий пролонгированную эффективную доставку пептидов в зону очага инфицированного ожога.

С помощью диско-диффузионного метода (ДДМ) и метода микроразведений (ММР) определена антимикробная активность разработанных ниосомальных гелей с пептидами. Чувствительность преобладающей выделенной микрофлоры определяли к антимикробному ниосомальному гелю с пептидами и контролям. В качестве

контролей применяли диски, пропитанные цефтаролином и свободные, не пропитанные диски. 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 не пропитанные диски не обладали антибактериальной активностью. Выявлено, что антибактериальная активность ниосомального геля с пептидами была в три раза больше, чем в контроле и составила  $42,1 \pm 0,18$  мм.

Зоны задержки роста *S. epidermidis* для дисков с цефтаролином составила  $14,8 \pm 0,12$  мм соответственно. Аналогичная ситуация наблюдалась к использованным в качестве контроля свободным от геля дискам, которые не обладали антибактериальной активностью.

Использованный метод позволил определить минимальную концентрацию антимикробных препаратов, подавляющую видимый рост микроорганизма. Таким образом, бактериологические исследования антимикробной активности ниосомальных гелей показали, что разработанные гели с пептидами подавляют рост выделенных микроорганизмов со значительно превосходящей контроли активностью.

По данным Бусыревой В.Н. и соавт. (2008) развитие инфекционных осложнений при травмах глаза в значительной степени связано с патогенным потенциалом микроорганизмов, при этом результативность микробиологической диагностики составляет 23% [14, 129, 234]. Доминирующими представителями микрофлоры являлись представители рода *Staphylococcus*, доля которых составила  $87,6 \pm 4,3\%$ , из них гемолитической активностью обладало  $23,7 \pm 5,5\%$ , коагулазопозитивными свойствами -  $12,5 \pm 3,6\%$ , а в 75,1% случаев был изолирован *S. epidermidis* [14]. Учёными в  $4,1 \pm 1,5\%$  случаев также была выделена грамотрицательная микрофлора, то есть более трети патогенов имела достаточно высокую вирулентность, проявляющуюся при благоприятных условиях. *Staphylococcus spp.*, в отличие от признанных патогенов, относятся к числу условно-патогенных микроорганизмов. Их вирулентные свойства проявляются только при снижении иммунореактивности макроорганизма и колонизации [19]. В этом контексте исследования клеток

иммунитета при инфицированном ожоговом поражении глаза приобретают особую клиническую значимость.

Доклинические исследования на животных являются обязательным критериальным показателем безопасности разработанных антимикробных соединений. При изучении безопасности антимикробного ниеосомального геля с выделенными пептидами в исследовании диапазон переносимых, токсических и летальных доз антимикробного ниеосомального геля было доказано, что применение геля не привело к гибели крыс и мышей и не вызвало изменений их поведения и основных физиологических функций. Полученные факты свидетельствуют об отсутствии острой токсичности у испытуемого геля.

Феномен иммунологически привилегированного органа появился у глаза в процессе эволюции [9, 41, 91, 102]. Учёными установлено, что содержание иммунологической привилегированности заключается в действии ряда факторов и особом сосудистом русле, заключающемся в отсутствии лимфатического оттока у сосудов крови на фоне афферентного типа дренажа. Такой гемато-глазной барьер обуславливает прочную защиту от чужеродных микроорганизмов [104, 132, 156, 174]. Помимо этого, существует иммуносупрессивное микроокружение (ТФРР, а-МСГ, ВИП), CD8<sup>+</sup>-лимфоциты. В.П. Еричев с соавт. (2009) установил, что эти факторы включают: иммуносупрессивное микроокружение, CD8<sup>+</sup>-лимфоциты, но лидирующую роль занимают цитокины [30]. Цитокины представляют собой группу белковых медиаторов, выполняющих регуляторную функцию в развитии и регулировании защитной воспалительной реакции, а также пластических и репаративных процессов. Цитокины синтезируются рядом клеток, являясь важным звеном гуморального иммунитета. Настолько важным, что, к примеру, играют определённую роль в патогенезе заболевания, вызванного ретровирусом COVID-19, семейства *Coronaviridae* в человеческом организме. Известно, что вирусы используют эндосомальный путь для внутриклеточного проникновения. Наиболее серьёзной проблемой для макроорганизма является иммунная активация вирусом COVID-19 цитокиновой атаки (цитокиновый шторм). Чрезмерная активация цитокинов приводит к эндотелиальной дисфункции, например, вызывая утечку жидкости и ее

накопление в плевральной полости, приводящее, в частности, к воспалению альвеол [44, 52, 54]. Затем эти сосудистые нарушения могут приводить к остановке вентиляции лёгких. Исследование цитокинов в слёзной жидкости активно используется при изучении патогенеза множества заболеваний переднего отрезка глаза. Опубликованы исследования, посвященные изменению системного и локального цитокинового профиля при офтальмопатологиях [30]. Благодаря исследованиям цитокинов были объяснены различные варианты течения воспаления при инфекционных поражениях переднего отрезка глаза [1, 47]. Исследование ключевой роли цитокинов позволило взглянуть на протекающие патологические процессы уже не на тканевом, а на клеточном и молекулярном уровнях. Обладая знаниями о роли иммунных клеток в патогенезе инфицированного ожога глаза, можно подходить к вопросу прогнозирования болезни и подбора патогенетически ориентированной терапии [52, 53].

Для изучения действия разработанного антимикробного ниосомального геля на течение регенерации инфицированных химических ожогов роговицы исследовали цитокиновый статус экспериментальных животных. Развитие ожоговой раны в группе контроля (с инфицированным щелочным ожогом, без лечения) обуславливает повышение уровня провоспалительных цитокинов. Количество IL-1 $\beta$  увеличивалось на протяжении 3 недель наблюдения, TNF- $\alpha$  и IL-8 в течение 28 дней. Это сопровождалось нарушением репаративной регенерации и снижением скорости заживления химического ожога. Свидетельством роли провоспалительных цитокинов в антибактериальном механизме являлись данные, полученные в результате применения ниосомального антимикробного геля с пептидами. Его применение сокращало период цитокиновой активности (нормализация IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, TNF- $\alpha$  – на 21 сутки), что приводило к ускорению процессов заживления инфицированной ожоговой раны.

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 сокращает период цитокиновой активности при нормализации концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 на 14 сутки, а TNF- $\alpha$  – на 21 сутки. Это сопровождается 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 52+11,5 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 происходит повреждение тканей глаза. Это стимулирует выработку ИЛ-1, так как этот цитокин является регулятором воспаления в организме. Понижение концентрации ФНО- $\alpha$  в слёзной жидкости животных с ожоговым поражением глаза связано с наступлением повреждения кератоцитов, являющихся их продуцентами.

Гистологические исследования являются важным критерием эффективности лечения антимикробного ниосомального геля с пептидами при лечении инфицированных химических ожогов в эксперименте. Такие исследования были проведены на животных, получивших стандартные, тяжелые химические ожоги роговицы 3 степени. При экспериментальном химическом ожоге в роговице развивались дистрофические, деструктивные и воспалительные изменения в эпителии, эндотелии и собственной оболочке. Дистрофические изменения эпителия и эндотелия характеризуются развитием гидропической и баллонной дистрофии, некроза эпителиоцитов и эндотелиоцитов, десквамацией и изъязвлением с образованием эрозий. В собственной оболочке роговицы наблюдается отек и воспалительная инфильтрация с развитием серозного, а затем гнойного кератита, образованием очагов кератомалиции, набуханием и распадом коллагеновых волокон. Серозный кератит наблюдается в первые 3-е суток, а затем переходит в гнойный (5-е сутки). На 7-е сутки на фоне гнойного кератита появляются очаги кератомалиции, деструкции коллагеновых волокон, отслойка эпителиального пласта и десквамация его на

значительном протяжении с эрозированием поверхности. Применение антимикробного ниосомального геля с пептидами приводит к оптимизации процессов эпителизации раневой зоны, стимуляции митотической активности базальных и шиповатых клеток переднего эпителия, лимитировании апоптотической доминанты эпителиоцитов и фибробластов собственного вещества роговицы. Происходит купирование отека, рассасывание воспалительных инфильтратов, сохранение целостности эпителиального пласта и эндотелия, отсутствуют деструктивные изменения в тканях роговицы, полностью восстанавливается гистологическая структура органа. 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 химического ожога проводили также в эксперименте. Исследования выполнены на 60 глазах 30 кроликов породы шиншилла обоего пола массой 2,1 - 3,5 кг. Изучена эффективность применения антимикробного ниосомального геля с пептидами для лечения инфицированных химических ожогов роговицы. Модель химического ожога воспроизводили при помощи 10 % раствора едкого натра, время экспозиции 20 секунд, после предварительной инсталляционной анестезии 0,5 % раствором алкаина. Через 2 часа после нанесения ожога проводилась контрольная оценка тяжести ожогов роговой оболочки и распределение животных по группам. У всех животных были получены стандартные, тяжелые химические ожоги роговицы 3 степени. Лечение гелем начинали через 3 часа после нанесения химического ожога. Животные были разделены на две группы опытную и контрольную по 10 кроликов (20 глаз в каждой группе). В опытной группе лечение осуществлялось с помощью нанесения 0,05 мл ниосомального геля с низкомолекулярными пептидами на ожоговую поверхность 1 раз в сутки в течение 10 дней. Контролем служила группа животных, которым проводили лечение 3% тетрациклиновой мазью. В результате проведенной работы было показано,

что химический ожог вызывают гидролиз структуры белка и разрушение клеток, приводя к некрозу тканей. Наблюдается гидратация, с последующим помутнением стромы роговицы и трабекулярной сети, что при увеличении выработки факторов воспаления может привести к потере зрения. Использование ниосомального геля ускоряло и стимулировало регенерацию поврежденной роговицы и конъюнктивы намного эффективнее по сравнению с 1 % тетрациклиновой мазью. Ниосомы способствовали равномерному и долговременному эффекту присутствия на поверхности роговицы активных веществ ниосомального геля, пролонгируя их непрерывное поступление в более глубокие слои очага поражения, восстанавливая дефекты эпителия роговицы и практически полностью снижая воспалительные реакции. Установлено, что применение антимикробного ниосомального геля с пептидами в качестве наружного лечебного средства, при экспериментальных химических ожогах, способствуют 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.

Полученные результаты позволяют расширить антибактериальный спектр и улучшить антимикробную эффективность к антибиотико-резистентным штаммам при использовании разработанного геля. Новый способ борьбы с устойчивостью к антибиотикам в дальнейшем будет апробирован в клинических исследованиях. Однако очевидно, что антимикробные ниосомальные гели на основе дефензинов могут помочь решить современные проблемы устойчивости к антибиотикам. Преимущественные механизмы их применения заключаются в следующем: 1) разработанные гели, как новая система доставки лекарств, обеспечивающая устойчивое высвобождение антимикробных эндогенных пептидов, могут оказывать пролонгированное антимикробное действие и избегать скрининга резистентных бактерий; 2) в соответствии с множественными механизмами наноконтейнеров кремнийорганической природы и других антибактериальных ингредиентов бактериям трудно развить устойчивость, направленную только на одну цель; 3) различные ингредиенты могут проявлять синергетический эффект.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с бактериальными осложнениями химических ожогов роговицы культуральным методом установлено появление патогенных штаммов стафилококков, которые способствовали созданию благоприятных условий для наслоения кандидозной инфекции, причём грамположительная микрофлора встречалась в 96%, грамотрицательная - в 2%, грибы - в 2% случаев.
2. Разработана технология выделения эндогенных антимикробных и низкомолекулярных пептидов, их инкапсулирование в кремнийорганические ниосомы, что позволило получить гель, обеспечивающий пролонгированную эффективную доставку пептидов в зону очага инфицированного ожога.
3. Микробиологические исследования ниосомального геля с пептидами в диско-диффузионном методе и методе микроразведений продемонстрировали его антимикробную активность, превышающую в 2,8 раз традиционно применяемую 1% тетрациклиновую глазную мазь.
4. Результаты исследований безопасности полученного ниосомального геля на разных группах животных свидетельствовали об отсутствии его токсичности.
5. Изучение уровня цитокинов в слезной жидкости показало их роль в процессе ранозаживления, патоморфологические изменения у экспериментальных животных при лечении инфицированного ожога роговицы продемонстрировали синергию антимикробного и регенераторного действия ниосомального геля, проявленную в оптимизации процессов эпителизации раневой зоны и восстановлении 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 рекомендовано рассматривать как фактор риска развития инфекционных осложнений при травмах и ожогах глаза. В случае резидентного носительства необходимо проведение санации роговицы с целью элиминации возбудителя.

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

Доказанная антимикробная и регенераторная активность 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 выделенных эндогенных дефензинов.

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

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

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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП - антимикробные пептиды

БАВ – биологически активные вещества

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВИЧ – вирус иммунодефицита

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

г - грамм

Гц - Герц

ДДМ – диско–диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕСМ - внеклеточная матрица

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИЛ- интерлейкины

кДа - килодальтон

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МКБ – международная классификация болезней

Мкл - микролитр

мкМ – микрометр

мл – миллилитр

мл/мин – миллилитр в минуту

НИР – научно–исследовательская работа

нм – нанометр

об/мин – оборотов в минуту

ПАВ – поверхностно–активное вещество

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РФ – Российская Федерация

см - сантиметр

СтГМУ – Ставропольский государственный медицинский университет

СтавНИПЧИ- Ставропольский государственный медицинский Университет

ГБУЗ СК «СККБ» - Государственное бюджетное учреждение здравоохранения  
Ставропольского края «Ставропольская краевая клиническая больница»  
США – Соединённые Штаты Америки  
ТД – терапевтическая доза  
ТУ – техническое условие  
ТФР- тромбоцитарный фактор роста  
УФ – ультрафиолетовые лучи  
ФС – Федеральный стандарт  
°С - градусы по Фарингейту  
Да - дальтон  
GF – growth factor  
IL – интерлейкины  
М - моль  
МВТ- масс бактериальный тест-стандарт  
NCCLS – Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам  
р – уровень значимости  
рН – водородный показатель

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Ж.И. Препараты системы цитокинов / Ж.И. Авдеева, Н.В. Медуницын // Цитокины и воспаление. — 2002. - Т. 1, № 2. - С. 33.
2. Аветисов, С.Э. Офтальмология: Национальное руководство под ред. С.Э. Аветистова, Е.А. Егорова, Л.К. Мошетовой, В.В. Нероева // М. ГЕОТАР-Медиа, 2008. – С. 443–444.
3. Анджелов, В.О. Лабораторная диагностика офтальмоинфекций: задачи, методы, критерии оценки клинической значимости / В.О. Анджелов, Г.И. Кричевская // Материалы научно-практической конференции. Офтальмо-иммунология. Итоги и перспективы, 25-27 ноября 2007 г. – Москва, 2007. - С. 36–39.
4. Анджелов, В.О. Основные тенденции развития современной офтальмо-иммунологии и офтальмовирусологии / В.О. Анджелов, Н.С. Зайцева, О.С. Слепова // Сб. науч.-практ. конф.: основные тенденции развития современной офтальмологии. - Москва, 1995. - С.68–72.
5. Базиков, И.А. Оценка репаративной способности, антимикробной и лимфоцитарной активности ниосомального геля "Регенерин" в стоматологической практике / И.А. Базиков, А.А. Долгалев, А.Н. Квочко, В.А. Зеленский, М.А. Матюта, А.А. Долгалева, Е.А. Гоптарева, В.И. Королькова // Бактериология. - 2018. - Т. 3, № 2. - С. 7-11.
6. Базиков, И.А. Влияние опытного образца трансдермального седативного геля на психофизиологическое состояние экспериментальных животных / И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, Э.В. Бейер, О.И. Боев, О.И. Седых // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. –Т.14, №1. - С.156-158.
7. Базиков, И.А. Гистологические исследования органов в эксперименте при применении ниосомальной формы противоопухолевого вещества / А.В. Аксенов, А.Н. Мальцев, В.С. Боташева, А.В. Корниенко, В.И. Королькова, Ф.И. Базиков // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. - № 4. - С. 672-675.

8. Базиков, И.А. Выделение эндогенных антимикробных пептидов и инкапсулирование их в кремнийорганические нiosомы / И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых, В.А. Батулин, А.Д. Болатчиев, А.А. Ефременко // Бактериология. - 2019. - Т. 4, № 3. - С. 14-17.
9. Бикбов, М.М. Цитокины в клинической офтальмологии / М.М. Бикбов, Н.Е. Шевчук, В.Б. Мальханов - Уфа: ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», 2008. - 152 с.
10. Болатчиев, А.Д. Разработка нiosомального лекарственного геля с альфа-дефензином hnp-1/ А.Д. Болатчиев, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2018. - С.16-17.
11. Болатчиев, А.Д. Изучение эффективности нiosомального лекарственного геля с альфа-дефензином hnp-1 при лечении больных с диагнозом: сахарный диабет с синдромом диабетической стопы / А.Д. Болатчиев, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С.18-20.
12. Болатчиев, А.Д. Влияние нiosомального антимикробного пептида hBD-1 на скорость заживления инфицированных ран у крыс / А.Д. Болатчиев, В.А. Батулин, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2018. - № 3. - С. 515-517.
13. Боровских, Е.В. Микробный спектр и чувствительность к антибиотикам микрофлоры, встречающейся у больных с воспалительными заболеваниями глаз / Е.В. Боровских, И.М. Боробова, В.В. Егоров // Офтальмологические ведомости. - 2014. - Т. 7, № 1. - С. 13–18.
14. Бусырева, В. Н. Исследование резистентности микроорганизмов, полученных от больных с инфекционными осложнениями травмы глаза / В.Н. Бусырева // Материалы научной сессии ПГМА. - 2008. - С. 112–116.

15. Варданыян, И.Р. Клинико-иммунологическая характеристика и лечение больных с ожогами глаз и послеожоговыми бельмами роговицы: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Варданыян Игорь Рудикович. - М., 2000. - 201 с.
16. Вериго, Е.Н. Консервативная терапия в реабилитации больных с повреждениями органа зрения / Е.Н. Вериго, И.А. Кузнецова, Е.Н. Орлова, Ю.А. Капитонов, И.Ю. Романова // Вестник офтальмологии. – 2002. - №3. – С.34-37.
17. Внутриглазная раневая инфекция / А.М. Южаков, Р.А. Гундорова, В.В. Нероев, А.В. Степанов. — М.: Мед. информ. агенство, 2007. — 240 с.
18. Воронцова, Т.Н. Микрофлора конъюнктивальной полости и ее чувствительность к антибактериальным препаратам у детей в норме и при некоторых воспалительных заболеваниях глаз / Т.Н. Воронцова, В.В. Бржеский, Е.Л. Ефимова // Офтальмологические ведомости. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 61–65.
19. Воротеляк, Е.А. Стволовые клетки эпителиальных тканей / Е.А. Воротеляк, В.В. Терских // Биология стволовых клеток и клеточные технологии (под ред. М.А. Пальцева). — М.: Медицина, 2009. — Т. 2. — С. 53–74.
20. Вохмяков, А.В. Выбор оптимального антибиотика для профилактики– инфекционных осложнений в офтальмохирургии / А.В. Вохмяков, И.Н. Околов, П.А. Гурченко // Клиническая офтальмология. — 2007. — Т. 8, № 1. — С. 3740.
21. Гренкова, Т.А. Отечественная виросомальная вакцина. Оценка эффективности и безопасности / Т.А. Гренкова, Е.П. Селькова, Н.В. Гудова // Медицинский совет. – 2015. – № 4.– С. 96-100.
22. Гундорова, Р.А. Смещение акцентов в этиологии ожоговой болезни / Р.А. Гундорова // Ожоги глаз и их последствия: Мат. науч.-практ. Конференции. — Москва, 1997. — С. 1–2.
23. Гундорова, Р.А. Приоритетные направления в проблеме глазного травматизма / Р.А. Гундорова // Материалы VII съезда офтальмологов России, 23-24 апреля 2000 г., Москва. — Москва, 2000. — С. 55–60.
24. Гундорова, Р.А. Пролиферативный синдром при ожоговой болезни глаз / Р.А. Гундорова, П.В. Макаров, А.Э. Кугушева // VII международная научно-

- практическая конференция «Пролиферативный синдром в офтальмологии». Сб. науч. тр. — Москва, 2012. — С. 37–39.
25. Гундорова, Р.А. История научных исследований по диагностике, хирургическому и медикаментозному лечению патологии роговицы: практическое руководство / Р.А. Гундорова. — М.: 2014. — 80 с.
  26. Гусева, М.Р. Научно-практический анализ травм глаз у детей по данным глазного стационара Морозовской детской клинической городской больницы / М.Р. Гусева, Н.С. Бадинова, М.Б. Бесланеева, Е.Д. Горбунова, Ю.Д. Кузнецова, И.Г. Кан // Российская педиатрическая офтальмология. - 2008. - № 2. - С. 6 - 10.
  27. Давыдов, Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века / Д.С. Давыдов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. – Т. 18, № 1. – С. 50-56.
  28. Дискаева, Е.И. Оценка применимости фотометрического метода для определения размера везикул ниосомной дисперсии / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, О.В. Вечер, В.П. Тимченко, М.А. Селимов // Медицинский вестник Северного Кавказа. -2018. - Т.1, № 1.- С. 108-110.
  29. Дискаева, Е.И. Корреляция размера ниосомальных везикул и оптической плотности раствора ниосомальной дисперсии / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.В. Вечер, Ф.И. Базиков // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 5 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2019. - С.166-168.
  30. Дискаева, Е.И. Изучение скорости движения кремнийорганических ниосом с парамагнитными свойствами / Е.И. Дискаева, И.А. Базиков, А.Н. Мальцев, О.В. Вечер, Ф.И. Базиков // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 5 международной научно-практической конференции. - Ставрополь, 2019. - С.103-108.

31. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам [Электронный ресурс] / EUCAST (дата обр. 20.07.2018).
32. Егоров, Е.А. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы / Е.А. Егоров, Н.И. Калинин, А.П. Киясов // Вестник офтальмологии. — 1999. — Т.115, №6. — С.13–16.
33. Еричев, В.П. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней / В.П. Еричев, С.Ю. Петров, А.М. Суббот // Национальный журнал глаукома. — 2017. — №1. — С.85–99.
34. Егорова, Н.С. Репаративный эффект биоконструкции на основе коллагена I типа и клеток булбарного эпителия при лечении глубоких дефектов роговицы в эксперименте / Н.С. Егорова, Е.В. Ченцова, М.С. Макаров // Трансплантология. — 2017. — Т. 9, №3. - С.54-57.
35. Егорова, Н.С. Технологии создания, оценка биосовместимости и безопасности коллагенового матрикса в составе биоинженерной клеточной конструкции / Н.С. Егорова, Е.В. Ченцова, С.В. Флора // Российский офтальмологический журнал. — 2017. — №2. — С.71–78.
36. Ермолаев, В.Г. Клинические и хрономедицинские аспекты производственного глазного травматизма / В.Г. Ермолаев, А.В. Ермолаев // Теоретические и клинические исследования как основа медикаментозного и хирургического лечения травм органа зрения. Материалы научно-практической конференции. — Москва, 2000. — С.7–8.
37. Ермолов, А.С. Биологическая повязка для лечения ожоговых ран 3а степени / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, З.Б. Хзатов, Л.П. Истранов, Л.Л. Миронова, Е.Г. Колокольчикова, М.В. Сычевский, В.С. Бочарова // Хирургия. - 2008. - № 10. - С.4-9.
38. Зильбер, Н.А. И.И. Мечников и учение об иммунитете / Н.А. Зильбер. Научное наследство. — М.-Л.: Издательство АН СССР, 1948. — Т. 1. — С. 482–519.

39. Калинин, Н.И. Новые стимуляторы репаративной регенерации роговицы в лечении заболеваний переднего отрезка глаза: автореферат дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Калинин Нелли Ильясовна. — М., 2000. — 24с.
40. Капитонов, Ю.А. Коррекция протеолиза роговицы в ранние сроки после химического ожога: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Капитонов Юрий Александрович. — М., 2001. — 260 с.
41. Капитонов, Ю.А. Локальная регуляция протеолиза в роговице после щелочного ожога / Ю.А. Капитонов, Е.В. Ченцова, Н.Б. Чеснокова // Ожоги глаз и их последствия. Мат. науч.-практ. конференции. — Москва, 1997. — С. 16–19.
42. Каранадзе, Н.А. Изучение бактериальной флоры конъюнктивы глаз и ее чувствительности к антибиотикам / Н.А. Каранадзе, А.М. Южаков // Офтальмологический журнал. — 1984. — № 1. — С. 54–57.
43. Каспаров, А.А. Офтальмогерпес / А.А. Каспаров. — М.: Медицина, 1994. — 224 с.
44. Каспарова, Е.А. О применении цитокинов и их комплексов в офтальмологии / Е.А. Каспарова // Вестник офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 47–49.
45. Каспарова, Е.А. Послеоперационная буллезная кератопатия: трансплантационные и нетрансплантационные методы лечения / Е.А. Каспарова, С.В. Труфанов, Н.В. Бородина // Тезисы докладов Девятого съезда офтальмологов России. — Москва, 2010. — С. 307.
46. Каспарова, Е.А. Рецидивирующая эрозия роговицы: диагностика и лечение / Е.А. Каспарова, А.А. Каспаров, Н.Р. Марченко // Вестник офтальмологии. — 2010. — Т. 126, № 5. — С. 3–8.
47. Керимов, К.Т. Ожоги глаз: патогенез и лечение / К.Т. Керимов, А.И. Джафаров, Ф.С. Гахраманов. — Москва: РАМН, 2005. - 462 с.
48. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. – Версия 2021-01. – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

- (МАКМАХ 1998-2022), 2021. – 206 с. <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (дата обращения 20.01.2022)
49. Ковалева, Л.А. Алгоритмы фармакотерапии бактериальных язв роговицы / Л.А. Ковалева, Е.С. Вахова // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 46-48.
  50. Ковалева, Л.А. Роль аутоиммунного компонента при центральных язвах роговицы / Л.А. Ковалева, О.С. Слепова, И.Г. Куликова, Е.А. Миронкова // Российский офтальмологический журнал. - 2013. - Т. 6, № 2. - С. 29-31.
  51. Ковалева, Л.А. Патогенетическая роль системной тканеспецифической ауто-сенсibilизации при инфекционных язвах роговицы центральной локализации / Л.А. Ковалева, И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.В. Яни // VI Междисциплинарный конгресс по заболеваниям органов головы и шеи. Тезисы докладов. - Москва, 2016. - С. 33-34.
  52. Козлов, Р.С. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам на среде АГВ и агарах Мюллер-Хинтона и изо-сенси-тест / Л.С. Страчунский, Д.М. Ливермор, О.У. Стецюк, Е.П. Шаврикова // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 22-27.
  53. Конькова, А.Ю. Опыт серологического обследования пациентов с увеитами с целью расшифровки этиологии заболевания / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — Т. 9, № 2. — С. 181–183.
  54. Конькова, А.Ю. Анализ причин возникновения воспалительных заболеваний сосудистого тракта глаза / А.Ю. Конькова, Д.А. Бояршинов, Т.В. Гаврилова, М.Б. Гитман // Российский журнал биомеханики. — 2019. — Т. 23, № 1. — С. 22–32.
  55. Конькова, А.Ю. Роль комплексного клинико-анамнестического и лабораторного обследования при уточнении этиологии эндогенных увеитов / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова, М.Д. Пожарицкий, М.В. Черешнева // Офтальмология. – 2019. – Т. 16, № 2. – С.202–209.

56. Конькова, А.Ю. Сравнительная характеристика биологических свойств стафилококков, изолированных из слезной жидкости, полости носа и зева пациентов с эндогенными увеитами / А.Ю. Конькова, Э.С. Горовиц, Т.В. Гаврилова // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. — 2019. — Вып. 2. — С. 159–166.
57. Кочергин, С.А. Иммуитет глазного яблока и конъюнктивальная микрофлора / С.А. Кочергин, Г.М. Чернакова, Е.А. Клещева // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 3. — С. 635–644.
58. Кочергин, С.А. Локальный цитокиновый профиль при аденовирусной инфекции / С.А. Кочергин, Г.М. Чернакова, Е.А. Клещева, М.Е. Шаповал, М.В. Мезенцева // Офтальмологические ведомости. — 2011. — № 3. — С.32–40.
59. Кузнецова, О.Ю. Первый опыт определения микробиоценоза глазной поверхности методом газовой хромато-масс-спектрометрии / О.Ю. Кузнецова, М.Г. Комарова, О.В. Никулина // Современные технологии в офтальмологии. — 2016. — № 3. — С. 166–171.
60. Куликова, И.Г. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в развитии системного иммунного ответа на антигены тканей глаза / И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.В. Денисова, Л.А. Ковалева, П.В. Макаров, Д.Н. Ловпаче // Медицинская иммунология. - 2015. - Т.17, № 2. - С. 179-182.
61. Куликова, И.Г. Частота сдвигов от нормы в субпопуляционном составе крови у пациентов с центральной язвой роговицы / И.Г. Куликова, Н.В. Балацкая, Л.А. Ковалева, П.В. Макаров // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 2. – С. 263-270.
62. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
63. Лошкарева, А.О. Применение богатой тромбоцитами плазмы у пациентов с хроническими эрозиями роговицы / А.О. Лошкарева, Д.Ю. Майчук // Офтальмохирургия. – 2016. - №4. – С.131-132

64. Макаров, П.В. К хирургической тактике лечения тяжелой и особо тяжелой ожоговой травмы глаз (сообщение 2) / П.В. Макаров // Вестник офтальмологии. — 2002. — № 4. — С. 8–10.
65. Макаров, П.В. Лимбальная трансплантация в хирургической реабилитации пациентов, перенесших тяжелые ожоги глаз / П.В. Макаров, Р.А. Гундорова, И.С. Чернетский, О.Г. Оганесян // Вестник офтальмологии. - 2007. - Т. 123, №3. - С. 9-12.
66. Мальцев, А.Н. Влияние применения нiosомального седативного геля с фитозэкстрактами на гематологические показатели крови лабораторных животных / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, Э.В. Бейер, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее материалы v международной научно-практической конференции. - 2019. - С. 152-154.
67. Мальцев, А.Н. Количественная и функциональная оценка регенераторной эффективности антимикробных средств для кожных покровов при сочетанном применении с низкомолекулярными плацентарными пептидами препарата «Регенерин» / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С.29-39.
68. Мальцев, А.Н. Эффективность сочетанного применения антимикробных средств и пептидного препарата «Регенерин» при лечении гнойных ран в эксперименте /А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4 международной научно-практической конференции. – Ставрополь, 2018. - С. 39-45.
69. Мальцев, А.Н. Определение оптимальных эффективных доз содержания пептидов в антимикробных препаратах / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, О.И. Седых // Сборник материалов 4 международной научно-практической конференции: Биотехнология: взгляд в будущее. – Ставрополь, 2018. - С. 45-48.
70. Мальцев, А.Н. Выделение природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови / А.Н. Мальцев, И.А. Базиков, В.Н. Батулин, А.А. Ефременко, Л.В. Лысогора // Сборник материалов

- VI Всероссийской научной-практической конференции с международным участием, 29 ноября Москва. - Москва, 2019.- С.138.
71. Манукян, М.Е. Репаративная регенерация роговицы при кислотном и щелочном ожоге и ее стимуляция: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07 / Манукян Марат Евгеньевич. — Тбилиси, 1983. — 19 с.
  72. Майчук, Ю.Ф. Профилактика и эпидемиология слепоты в мире / Ю.Ф. Майчук. — М., 1986. — 80 с.
  73. Майчук, Ю.Ф. Терапевтические алгоритмы при инфекционных язвах роговицы / Ю.Ф. Майчук // Вестник офтальмологии — 2000. — № 3. — С. 35–37.
  74. Майчук, Ю.Ф. Современные возможности диагностики и терапии инфекционных поражений глазной поверхности / Ю.Ф. Майчук // Материалы IX съезда офтальмологов России. — Москва, 2010. — С. 338–340.
  75. Майчук, Ю.Ф. Выбор лекарственной терапии при различных клинических формах болезни сухого глаза / Ю.Ф. Майчук, Е.В. Яни // Офтальмология. — 2012. — №9. — С. 58–64.
  76. Майчук, Ю.Ф. Новые подходы в лечении блефаритов / Ю.Ф. Майчук, Е.В. Яни // Катаральная и рефракционная хирургия. — 2012. — №1. — С. 59–62.
  77. Миронов, А.Ю. Молекулярные механизмы резистентности к  $\beta$ -лактамам патогенов внутрибольничных инфекций / А.Ю. Миронов, И.В. Крапивина, Д.Е. Мудрак, Д.В. Иванов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 1. — С. 39–43.
  78. Мороз, О.В. Современные аспекты лечения ран с использованием биологически активных повязок в офтальмохирургии / О.В. Мороз // Офтальмохирургия. — 2014. — Т. 1. — С. 90–94.
  79. Никитин, Н.А. Роль TGF $\beta$  в офтальмологии / Н.А. Никитин, Ш.Р. Кузбеков // Цитокины и воспаление. — 2009. — Т. 8, № 1. — С. 3–9.
  80. Николаева, Л.Р. Лимбальная клеточная недостаточность / Л.Р. Николаева, Е.В. Ченцова // Вестник офтальмологии. — 2006. — Т. 122, № 3. — С. 43–47.

81. Новикова, И.С. Применение коллагена в медицинских целях / И.С. Новикова, С.А. Сторублевцев // ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий». - Воронеж, 2012.- С.32-34.
82. Новицкий, И.Я. Трансплантация амниотической оболочки с фиксацией в слоях роговицы / И.Я. Новицкий, М.Н. Сарахман, Т.М. Смаль // Офтальмохирургия. – 2003. - № 3. - С. 4-7.
83. Овчарова, Н.Г. Применение покрытия «Цитокол» в лечении комбинированных ожогов глаз: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Овчарова Наталья Георгиевна. – Москва, 2012. –180 с.
84. Околов, И.Н. Нормальная микрофлора конъюнктивы у офтальмо-хирургических пациентов / И.Н. Околов, П.А. Гурченко, А.В. Вохмяков // Офтальмол. ведомости. — 2008. — Т. 1, № 3. — С. 18–21.
85. Околов, И.Н. Резистентность к антибиотикам коагулазонегативных стафилококков, выделенных у больных конъюнктивитами / И.Н. Околов, П.А. Гурченко, А.В. Вохмяков // Офтальмол. ведомости. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 43–47.
86. Патент 2655522 Российская Федерация, МПК А61К9/127 Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв/ А.Д. Болатчиев, В.А. Батурин, И.А. Базилов; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России. - № 2017125898; заявл. 18.07.2017; опубл. 28.05.2018, Бюл. № 5.- 6 с.
87. Полонская, М.В. Разработка состава и технологии лиофилизированных глазных препаратов на коллагене: дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.01 / Полонская Мария Викторовна. — М., 2001. — 130 с.
88. Полуниин, Г.С. Блефарогели 1 и 2 – новое направление в профилактике и лечении блефаритов / Г.С. Полуниин, В.В. Куренков, Е.А. Каспарова, Е.Г. Полунина // Новое в офтальмологии. – 2004. - №1. - С. 44-47.
89. Полуниин, Г.С. Ингибиторы плазминоподобных ферментов и аутофибронектина в лечении эпителиальных дефектов роговицы / Г. С. Полуниин, А.А. Каспаров, И.А. Макаров // Вестник офтальмологии. — 1993. — №4. — С. 14–16.

90. Полуниин, Г.С. Показания и способы ферментотерапии в офтальмологической практике: дис. ... докт. мед. наук: 14.00.08 / Полуниин Геннадий Серафимович. — М., 1990. — 284 с.
91. Пронкин, И.А. Рецидивирующая эрозия роговицы: этиология, патогенез, методы диагностики и лечения / И.А. Пронкин, Д.Ю. Майчук // Офтальмохирургия. — 2015. — №1. — С. 62.
92. Романова, И.Ю. Применение адгелона в терапии рецидивирующей посттравматической эрозии роговицы / И.Ю. Романова, Е.В. Ченцова, Ю.А. Капитонов // Сборник научных трудов. — Москва, 1998. — С. 156.
93. Романова, И.Ю. Применение адгелона при травматических поражениях роговой оболочки: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Романова Ирина Юрьевна. — М., 2004. — 269 с.
94. Романова, И.Ю. Способ лечения химических ожогов глаз / И.Ю. Романова, Ю.А. Капитонов, Е.В. Ченцова // Современные лазерные технологии в диагностике и лечении повреждений органа зрения и их последствий: Материалы научно-практич. конф. — Москва, 1999. — С.134–135.
95. Сакович, В.Н. Характер микрофлоры конъюнктивальной полости глаза и ее чувствительность к антибиотикам при гнойных кератитах / В.Н. Сакович // Офтальмологический журнал. — 1991. — № 3. — С. 189–190.
96. Самойлов, А.Я. Туберкулезные заболевания глаз / А.Я. Самойлов, Ф.И. Юзефова, Н.С. Азарова. — Ленинград: Медгиз., 1963. — 256 с.
97. Симбирцев, А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2002. — № 1. — С. 9–16.
98. Ситник, Г.В. Современные клеточные биотехнологии в офтальмологии. Амниотическая мембрана как субстрат для культивирования стволовых эпителиальных клеток / Г.В. Ситник // Белорусский медицинский журнал. — 2006. — Т.4, №18. — С. 15–21.
99. Современная офтальмология: руководство / под редакцией проф. В.Ф. Даниличева. — 2-е изд. — СПб: Питер, 2009. — 688 с.

100. Стецюк, О.У. Сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам грамотрицательных аэробных бактерий диско-диффузионным методом на среде АГВ и агаре Мюллера-Хинтон / О.У. Стецюк, Г.К. Решедько // Лабораторная диагностика. – 2004. – Т. 6, № 2.– С. 155-167.
101. Теплинская, Л.Е. Эффективность лечения увеитов препаратом «Суперлимф» / Л.Е. Теплинская, Н.С. Филичкина, К.С. Матевосова // Вестник офтальмологии. — 2005. — № 4. — С. 22.
102. Федуненко, В.В. Экспериментально-морфологическое исследование влияния гидрогелевой основы повязки «Аполло-ПАК» на регенераторные процессы в роговице кролика / В.В. Федуненко, Д.В. Давыдов, А.В. Яковлев // Рефракционная хирургия и офтальмология. — 2005. — Т. 5, № 4 — С. 57–60.
103. Фомина, И.А. Применение фетальных клеток эпителия и кератобластов роговицы человека в эксперименте: дис. ... канд. мед.наук: 14.00.08 / Фомина Инга Александровна. — М., 2001. — 133 с.
104. Хаитов, Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство / Р.М. Хаитов. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 636 с.
105. Шепелин, А.П. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам / А.П. Шепелин, Т.П. Морозова, И.С. Косилова, Г.П. Глазкова, Л.В. Домотенко // Дезинфекция. Антисептика. — 2013. — № 1. — С. 43-48.
106. Ченцова, Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз: дис. ... докт.мед.наук: 14.00.08 / Ченцова Екатерина Валериановна. — М., 1996. — 304 с.
107. Ченцова, Е.В. Особенности течения ожоговой болезни глаз: пособие для врачей / Е.В. Ченцова, Ю.А. Капитонов, И.Ю. Романова. — М., 1999. — 10 с.
108. Ченцова, Е.В. Оптимизация метода выделения и культивирования клеток буккального эпителия на коллагеновых подложках для применения в офтальмологии / Е.В. Ченцова, О.И. Конюшко, М.С. Макаров // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2015. — № 1. — С.56–60.

109. Шаимова, В.А. Изучение состава микрофлоры клинически здоровой конъюнктивы и при бактериальном кератите / В.А. Шаимова // Актуальные проблемы офтальмологии: сб. тез. 9-й науч.-практ. конф. — Москва, 2006. — С. 85–87.
110. Шаимова, В.А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз / В.А. Шаимова // Цитокины и воспаление. — 2005. — № 2. — С. 13–15.
111. Шевчук, Н.Е. Интерфероновый статус больных герпетическим кератитом / Н.Е. Шевчук, В.Б. Мальханов, З.Р. Марванова // Проблемы офтальмологии. — 2007. — № 1. — С. 29–32.
112. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
113. Ямскова, В.П. Современный подход к правовой трансформации лекарственных веществ в офтальмо-травматологии / В.П. Ямскова, Ю.А. Капитонов, Е.П. Гурмизов, И.Ю. Романова // Неотложная помощь, реабилитация и лечение осложнений при травмах органа зрения и в чрезвычайных ситуациях: Материалы научно-практич. конф. — Москва, 2003. — С. 183-186.
114. Aagaard, K. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters/ K. Aagaard, J. Petrosino, W. Keitel // FASEB J. — 2013. - Vol. 27. — P. 1012 –1022.
115. Abdelkader, H. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations / H. Abdelkader, A.W. Alani, R.G. Alany // Drug Delivery. — 2014. — Vol. 21. — P. 87–100.
116. Adam, M. Conjunctival flora in diabetic and nondiabetic individuals / M. Adam, M. Balci, H.A. Bayhan // Turk. J. Ophthalmol. — 2015.— Vol. 45. — P. 193 – 196.
117. Amsler, K. Comparison of Broth Microdilution, Agar Dilution, and Etest for Susceptibility Testing of Doripenem against Gram-Negative and Gram-Positive Pathogens / K. Amsler, C. Santoro, B. Foleno, K. Bush, R. Flamm // Journal of Clinical Microbiology. — 2010. — V. 48, N. 9. — P. 3353-3357.

118. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Электронный ресурс]/WHO.[https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241564748\\_eng.pdf](https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241564748_eng.pdf) (дата обр. 19.12.2019 г.)
119. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O’Neill. December 2014. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. Chaired by Jim O’Neill. May 2016.
120. Aoki, W. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines / W. Aoki, K. Kuroda, M. Ueda // *J. Biosci Bioeng.* —2012. — Vol. 114. — P. 365–370.
121. Bailey, A.L. Multicenter Evaluation of the Etest Gradient Diffusion Method for Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* / A.L. Bailey, T. Armstrong, H.-P. Dwivedi, G.A. Denys, J. Hindler, S. Campeau, M. Traczewski, R. Humphries, C.A. Burnham // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2018. – V. 56, N. 9. – P. 717-725.
122. Baim, A.D. The microbiome and ophthalmic disease // A.D. Baim, A. Movahedan, A.V. Farooq // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* — 2019. — Vol. 244. — P. 419–429.
123. Bansal, S.S. Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention / S.S. Bansal, M. Goel, F. Aqil // *Cancer Prevent. Res.* — 2011. — Vol. 4. — P. 1158–1171.
124. Baranova, O. Medical hydrogels based on bioactive compounds. Synthesis, properties, and possible application for preparing bactericidal materials / O. Baranova, N. Kuz’min, T. Samsonova // *Fibre Chem.* — 2011. — Vol. 43. — P. 90–103.
125. Bardajee, G.R. A novel and green biomaterial-based silver nanocomposite hydrogel: synthesis, characterization and antibacterial effect / G.R. Bardajee, Z. Hooshyar, H. Rezanezhad // *J. Inorg. Biochem.* — 2012. — Vol. 117. — P. 367–373.
126. Blair, J.M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance / J.M. Blair, M.A. Weber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J. Piddock // *Nature Reviews Microbiology.* — 2015. – V. 13. – P. 42–51.

127. Bolatchiev, A.D. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats / A.D. Bolatchiev, V.A. Baturin, I.A. Bazikov, A.N. Maltsev // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2018. -Т. 13, № 3. - С. 515-517.
128. Bolatchiev, A. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains in vitro and in vivo / A.D. Bolatchiev, V.A. Baturin, I.A. Bazikov, A.N. Maltsev // Fundamental and Clinical Pharmacology. - 2020. - Т. 34, № 1. - P. 102-108.
129. Boost, M. Disturbing the balance: effect of contact lens use on the ocular proteome and microbiome / M. Boost, P. Cho, Z. Wang // Clin. Exp. Optom. — 2017. — Vol. 100. — P. 459–472.
130. Borroni, D. Metagenomics in ophthalmology: current findings and future perspectives / D. Borroni, V. Romano, S.B. Kaye //BMJ Open Ophthalmol. — 2019. — Vol. 4. — e000248.
131. Brannon-Peppas, L. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy / L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette // Adv. Drug. Deliver. Rev. — 2004. — Vol. 56. — P. 1649–1659.
132. Brogan, D.M. Critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility / D.M. Brogan, E.A. Mossialos // Global health. – 2016. – V. 12. – P. 8.
133. Buhrman, J.S. Proteolytically activated anti-bacterial hydrogel microspheres / J.S. Buhrman, L.C. Cook, J.E. Rayahin // J. Control. Rel. — 2013. — Vol. 171. — P. 288–295.
134. Burman, S. Ophthalmic application of preserved human amniotic membrane: a review of current indications / S. Burman, S. Tejwani, G.K. Vemuganti // Cell and Tissue Banking. — 2004. — Vol. 5. — P. 161–175.
135. Cantón, R. Etest versus broth microdilution for ceftaroline MIC determination with *Staphylococcus aureus*: results from PREMIUM, a European multicenter study / R. Cantón, D.M. Livermore, M.I. Morosini, J. Díaz-Regañón, G.M. Rossolini // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2017. – V. 72. – P. 431-436.

136. Carafa, M. A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: preparation and characterization / M. Carafa, C. Marianecchi, L. Di Marzio // *J. Pharm. Pharm. Sci.* — 2011. — Vol. 14. — P. 336–346.
137. Carmeli, Y. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a multicenter, pathogen-directed, phase 3 study / Y. Carmeli, J. Armstrong, P.J. Laud // *The Lancet Infectious Diseases.* — 2016. — V. 16. — P. 661-673.
138. Cavalieri, F. Nanomedicines for antimicrobial interventions / F. Cavalieri, M. Tortora, A. Stringaro // *J. Hosp. Infect.* — 2014. — Vol. 88. — P. 183–190.
139. Cavuoto, K.M. Composition and comparison of the ocular surface microbiome in infants and older children/ K.M. Cavuoto, S. Banerjee, D. Miller // *Transl. Vis. Sci. Technol.* — 2018. — Vol. 7. — P. 16.
140. Cavuoto, K.M. Relationship between the microbiome and ocular health / K.M. Cavuoto, S. Banerjee, A. Galor // *Ocul. Surf.* — 2019. — Vol. 17. — P. 384–392.
141. Chen, Z. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia / Z. Chen, C.S. De Paiva, L. Luo // *Stem Cells.* — 2004. — Vol. 22 (3). — P. 355–366.
142. Cho, B.J. Tandem scanning confocal microscopic analysis of differences between epithelial healing in limbal stem cell deficiency and normal corneal reepithelization in rabbits / B.J. Cho, A.R. Djalilian, E.J. Holland // *Cornea.* — 1998. — Vol. 17. — P. 68–73.
143. Choi, M.J. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems / M.J. Choi, H.I. Maibach // *Skin. Pharmacol. Physi.* — 2005. — Vol. 18. — P. 209–219.
144. Cleophas, R.T. Characterization and activity of an immobilized antimicrobial peptide containing bactericidal PEG-hydrogel / R.T. Cleophas, J. Sjol-lemma, H.J. Busscher // *Biomacromolecules.* — 2014. — Vol. 15. — P. 3390–3395.
145. Clinical and Laboratory Standards Institute / Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. — USA, 2015.

146. Costerton, J.W. How bacteria stick/ J.W. Costerton, G.G. Geesey, K.J. Cheng // *Sci. Am.* —1978. — Vol. 238. — P. 86–95.
147. Dasgupta, A. Peptide hydrogels / J.H. Mondal, D. Das // *RSC Adv.* — 2013. — Vol. 3. — P. 9117–9149.
148. Casteels, I. Current knowledge on the human eye microbiome: a systematic review of available amplicon and metagenomic sequencing data / I. Casteels, H. Delbeke, S. Younas // *Acta Ophthalmol.* - 2020.
149. Des Rieux, A. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach / A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot // *J. Control. Release.* — 2006. — Vol. 116. — P. 1–27.
150. Diskaeva, E.I. Particle size analysis of niosomes as a function of temperature/ E.I. Diskaeva, O.V. Vecher, I.A. Bazikov, D.S. Vakalov // *Наносистемы: физика, химия, математика.* -2018. -Т. 9, № 2. - P. 290-294.
151. Diskaeva, E.I. Investigation ultrasound influence on the size of niosomes vesicles on the based of peg-12 dimethicone / E.I. Diskaeva, I.A. Bazikov, O.V. Vecher, K.S. Elbekyan, L.S. Месyаceva // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* - 2018. – Т. 9, № 6. - P. 1016-1021.
152. Diskaeva, E.I. Dispersion analysis of niosomes different composition / E.I. Diskaeva, I.A. Bazikov, O.V. Vecher, A. N. Maltsev // *Journal of Nanoparticle Research.* - 2019. -Т. 21, № 1.- P. 21-24.
153. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K.L. Blanc, I. Mueller // *Cytotherapy.* —2006. — Vol. 8. — P. 315–317.
154. Dua, H.S. Limbal stem cells of the corneal epithelium / H.S. Dua, A. Az-uara-Blanco // *Surv. Ophthalmol.* — 2000. — Vol. 44. — P. 415–425.
155. Eder, M. Normal ocular flora in newborns delivered in two hospital centers in Argentina and Paraguay/ M. Eder, N. Farina, R.R. Sanabria// *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* — 2005. — Vol. 243. — P.1098 –1107.

156. Ejtahed, H.S. Worldwide trends in scientific publications on association of gut microbiota with obesity/ H.S. Ejtahed, O. Tabatabaei-Malazy, A.R. Soroush//Iran J Basic Med Sci. – 2019. – V. 22. – P. 65–71.
157. Ellington, M. J. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee / M.J. Ellington, O. Ekelund, F.M. Arestrup, R. Canton, M. Doumith, C. Giske // Clinical Microbiology and Infection. – 2016. – V. 23, N. 1. – P. 2–22.
158. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) // Clinical Microbiology and Infection. – 2003. – V.9. – P. 1-7.
159. Fjell, C.D. Designing antimicrobial peptides: form follows function / C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E. Hancock, G. Schneider // Nat. Rev. Drug. Discov. — 2011. — Vol. 11. — P. 37–51.
160. Funderburgh, J.L. Stem cells in the limbal stroma / J.L. Funderburgh, M.L. Funderburgh, Y. Yiqin Du // Ocul. Surf. — 2016. — Vol. 14. — P. 113–120.
161. Garcia-Barrasa, J. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications / J. Garcia-Barrasa, J.M. Lopez-de-Luzuriaga, M. Monge // Cent. Eur. J. Chem. — 2010. — Vol. 9. — P. 7–19.
162. Ghobril, C. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial / C. Ghobril, M.W. Grinstaff // Chem. Soc. Rev. — 2015. — Vol. 44. — P. 1820–1835.
163. Ghoubay-Benallaoua, D. Easy xeno-free and feeder free method for isolation and growing limbal stromal and epithelial stem cells of the human cornea / D. Ghoubay-Benallaoua, C. De Sousa, R. Martos // Plos One. —2017. — Vol. 17. — P. 1–18.
164. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс] who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\_Summary\_25FerET\_ NM\_WHO.pdf (дата обр. 24.04.2020 г.)

165. Gomes, J. Ocular Surface Microbiome in Health and Disease / J. Gomes, L. Frizon, V. Demeda // *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila)* — 2020. — Vol. 9. — P. 505–511.
166. Gonzalez, G. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential / G. Gonzalez, Y. Sasamoto, B.R. Ksander // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* — 2017. — Vol. 7. — P. 303.
167. Grzybowski, A. Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. / A. Grzybowski, P. Brona, S.J. Kim // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* — 2017. — Vol. 255. — P. 851–862.
168. Gude, R.P. Effects of niosomal cisplatin and combination of the same with theophylline and with activated macrophages in murine B16F10 melanoma model / R.P. Gude, M.G. Jadhav, S.G. Rao, A.G. Jagtap // *Cancer Biother. Radiopharm.* — 2002. — Vol. 17. — P. 183–192.
169. Gunduz, A. Conjunctival flora in Behçet patients/ A. Gunduz, T. Cumurcu, A. Seyrek // *Can. J. Ophthalmol.* — 2008. — Vol. 43. — P. 476–479.
170. Gunduz, G. The effect of chronic alcoholism on the conjunctival flora/ G. Gunduz, A. Gunduz, N. Polat // *Curr. Eye Res.* — 2016. — Vol. 41.— P. 734–739.
171. Hamidi, M. Hydrogel nanoparticles in drug delivery / M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2008. — Vol. 60. — P. 1638–1649.
172. Hemeg, H.A. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy / H.A. Hemeg // *Int. J. Nanomedicine.* — 2017. — Vol. 12. — P. 8211–8225.
173. Honda, R. Effect of long-term treatment with eyedrops for glaucoma on conjunctival bacterial flora / R. Honda, H. Toshida, C. Suto // *Infect Drug Resist.* — 2011. — Vol. 4. — P. 191–196.
174. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function, and diversity of the healthy human microbiome // *Nature.* — 2012. — Vol. 486. — P. 207–214.
175. Imanishi, J. Growth factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea / J. Imanishi, K. Kamiyama, I. Iguchi // *Prog. Ret. Eye Res.* — 2000. — Vol. 19. — P. 113–129.

176. Jiang, L. Self-assembly of cationic multidomain peptide hydrogels: supramolecular nanostructure and rheological properties dictate antimicrobial activity / L. Jiang, D. Xu, T.J. Sellati, H. Dong // *Nanoscale*. — 2015. — Vol. 7. — P. 19160–19169.
177. Jönsson, A. Performance characteristics of newer MIC gradient strip tests compared with the Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* / A. Jönsson, S. Jacobsson, S. Foerster, M.J. Cole, M. Unemo // *Journal Of Pathology, Microbiology And Immunology*. — 2018. — V. 126. — P. 822–827.
178. Jorgensen, J.H. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices / J.H. Jorgensen, M.J. Ferraro // *Clinical Infectious Diseases*. — V. 49. — P. 1749-1755.
179. Kang, H.K. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review / H.K. Kang, C. Kim, C.H. Seo, Y. Park // *J. Microbiology*. — 2017. — Vol. 55. — P. 1–12.
180. Keilty, R.A. The bacterial flora of the normal conjunctiva with comparative nasal culture study // *Am. J.Ophthalmol.* — 1930. — Vol. 13(10) . — P. 876–879
181. Khan, Z.A. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing / Z.A. Khan, M.F. Siddiqui, S. Park // *Diagnostics*. — 2019. — V. 9, N. 49. — P. 2-17.
182. Kittipibul, T. Comparison of the ocular microbiome between chronic Stevens-Johnson syndrome patients and healthy subjects / T. Kittipibul, V. Puangricharn, T. Chatsuwan // *Sci. Rep.* — 2020. — V. 10. — P. 4353
183. Lakshmaiah Narayana, J. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents / J. Lakshmaiah Narayana, J.Y. Chen // *Peptides*. — 2015. — Vol. 72. — P. 88–94.
184. Laverty, G. Antimicrobial peptide incorporated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for the prevention of *Staphylococcus epidermidis*-associated biomaterial infections / G. Laverty, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // *J. Biomed. Mater. Res. A*. — 2012. — Vol. 100. — P. 1803–1814.
185. Leger, A.J. Visions of eye commensals: the known and the unknown about how the microbiome affects eye disease/ A.J. St Leger, R.R. Caspi // *Bioessays*. - 2018. — Vol. 40. — e1800046.

186. Li, G.G. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells / G.G. Li, Y.T. Zhu, H.T. Xie // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2012. — Vol. 53. — P. 5686–5697.
187. Louis, B.R. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens / B.R. Louis // *Infection Control & Hospital Epidemiology.* – 2010. – P. 7–10.
188. Lu, W. Reduced expression of laminin-5 in corneal epithelial cells under high glucose condition / W. Lu, N. Ebihara, K. Miyazaki, A. Murakami // *Cornea.* — 2006. — Vol. 25. — P. 61–67.
189. Luznik, Z. Effect of cryopreserved amniotic membrane orientation on the expression of limbal mesenchymal and epithelial stem cell markers in prolonged limbal explant cultures / Z. Luznik, M. Hawlina, E. Malicev // *PLoS One.* — 2016. — Vol. 11. — P. 1–17.
190. Malmsten, M. Antimicrobial and antiviral hydrogels / M. Malmsten // *Soft Matter.* — 2011. — Vol. 7. — P. 8725–8736.
191. Manyi-Loh, C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications / C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer, A. Okoh // *Molecules.* – 2018. – V. 23, N. 4. – P. 795-843.
192. Martinez, J.L. A global view of antibiotic resistance / J.L. Martinez, A. Fajardo, L. Garmendia // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2009. — Vol. 33. — P. 44–65.
193. Martinez, J.L. Metabolic regulation of antibiotic resistance / J.L. Martinez, F. Rojo // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2011. — Vol. 35. — P. 768–789.
194. Moeller, C. Evaluation of normal ocular bacterial flora with two different culture media / Moeller C.T., Branco B.C., M.C. Yu // *Can. J. Ophthalmol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 448–453.
195. Nahar, N. Conjunctival bacterial flora in diabetic patients / N. Nahar, S. Anwar, M. Miah // *Ibrahim. Med. Coll. J.* — 2014. — Vol 7. — P. 5–8.
196. Nelson, J. The conjunctiva: normal flora // *Cornea: Fundamentals of cornea and external disease* / J. Nelson, J. Cameron, J. Krachmer, D. Palay. — 1998. — Vol. 1. — Mosby CD online.

197. Ng, V.W. Antimicrobial hydrogels: a new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections / V.W. Ng, J.M. Chan, H. Sardon // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2014. — Vol. 78. — P. 46–62.
198. Ozkan, J. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome / J. Ozkan, S. Nielsen, C. Diez-Vives // *Sci Rep.* — 2017. — Vol. 7. — P. 9880.
199. Ozkan, J. Identification and visualization of a distinct microbiome in ocular surface conjunctival tissue / J. Ozkan, M. Coroneo, M. Willcox, // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2018. — Vol. 59. — P. 4268–4276
200. Ozkan, J. The ocular microbiome: molecular characterisation of a unique and low microbial environment / J. Ozkan, M.D. Willcox // *Curr. Eye Res.* — 2019. — Vol. 44. — P. 685 – 694.
201. Panyam, J. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue / J. Panyam, V. Labhasetwar // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2003. — Vol. 55. — P. 329–347.
202. Perkins, R.E. Bacteriology of normal and infected conjunctiva / R.E. Perkins, R.B. Kundsinn, M.V. Pratt, I. Abrahamsen, H.M. Leibowitz // *J Clin Microbiol.* — 1975. — Vol. 1(2). — P. 147–149.
203. Pinto Reis, C. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles / C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga // *Nano-med.: Nanotechnol., Biol., Med.* — 2006. — Vol. 2. — P. 8–21.
204. Ramesh, S. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents / S. Ramesh, T. Govender, H.G. Kruger // *J. Pept. Sci.* — 2016. — Vol. 22. — P. 438–451.
205. Rasmussen, B. Filamentous microfossils in a 3235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit/B. Rasmussen// *Nature.* — 2000. — Vol. 405. — P. 676–679.
206. Rostami, E. Drug targeting using solid lipid nanoparticles / E. Rostami, S. Kashanian, A.H. Azandaryani // *Chem. Phys. Lipids.* — 2014. — Vol. 181. — P. 56–61.
207. Shahiwala, A. Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide / A. Shahiwala, A. Misra // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences: A*

- Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne des Sciences Pharmaceutiques. — 2002. — Vol. 5. — P. 220–225.
208. Shimizu, E. Commensal microflora in human conjunctiva; characteristics of microflora in the patients with chronic ocular graft-versus-host disease / E. Shimizu, Y. Ogawa, Y. Saijo // *Ocul. Surf.* — 2019. — Vol. 17. — P. 265–271.
209. Shin, H. Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing / H. Shin, K. Price, L. Albert // *mBio.* — 2016. — Vol. 7. — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4817251/pdf/mBio.00198-16.pdf>
210. Song, A. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and polyethylene glycol hydrogel as a potential scaffold for wound healing / A. Song, A.A. Rane, K.L. Christman // *Acta Biomater.* — 2012. — Vol. 8. — P. 41–50.
211. Steckbeck, J.D. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? / J.D. Steckbeck, B. Deslouches, R.C. Montelaro // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2014. — Vol. 14. — P. 11–14.
212. Suto, C. Conjunctival sac bacterial flora isolated prior to cataract surgery / C. Suto, M. Morinaga, T. Yagi // *Infect. Drug Resist.* — 2012. — Vol. 5. — P. 37–41.
213. Tacconelli, E. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria carriers / E. Tacconelli, F. Mazzaferri, A.M. De Smet, D. Bragantini, P. Eggimann, B.D. Huttner, E.J. Kuijper, J.-C. Lucet, N.T. Mutters, M. Sanguinetti, M.J. Schwaber, M. Souli, J. Torre-Cisneros, J.R. Price, J. Rodríguez-Bano // *Clinical Microbiology and Infection.* — 2019. — V. 25, N. 7. — P. 807–817.
214. Tacconelli, E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Chair: E. Tacconelli and N. Margrini. — USA, 2019. — URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html> (дата обр. 21.09.2020).
215. Thiel, H.J. Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 persons of various ages // H.J. Thiel, U. Schumacher // *Klin. Monbl. Augenheilkd.* — 1994. — Vol. 205. — P. 348–357.

216. Uchegbu, I.F. Nonionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug de-livery / I.F. Uchegbu, S.P. Vyas // *Int. J. Pharm.* — 1998. — Vol. 172. — P. 33–70.
217. Ueta, M. Innate immunity of the ocular surface / M. Ueta, S. Kinoshita // *Brain Res. Bull.* — 2010. — Vol. 81. — P. 219–228.
218. Veiga, A.S. Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels / A.S. Veiga, C. Sinthuvanich, D. Gaspar // *Biomaterials.* — 2012. — Vol. 33. — P. 8907–8916.
219. Versura, P. Sex-steroid imbalance in females and dry eye / P.Versura, G. Giannac-care, E.C. Campos // *Curr Eye Res.* — 2015. — Vol. 40. — P. 162 –175.
220. Xie, Z. Design of antimicrobial peptides conjugated biodegradable citric acid de-rived hydrogels for wound healing / Z. Xie, N.V. Aphale, T.D. Kadapure // *J. Bio-med. Mater. Res. A.* — 2015. — Vol. 103. — P. 3907–3918.
221. Watane, A. The microbiome and ocular surface disease //A. Watane, K.M. Cavu-oto, S. Banerjee // *Curr. Ophthalmol. Rep.* — 2019. — Vol. 7. — P. 196–203.
222. Wen, X. The influence of age and sex on ocular surface microbiota in healthy adults / X. Wen, L. Miao, Y. Deng // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2017. — Vol. 58. — P. 6030 –6037.
223. Willcox, M.D. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface/ M.D. Willcox//*Exp. Eye Res.* — 2013. — Vol. 117. — P. 99 –105.
224. Zegans, M. Biofilm forming potential of ocular fluid *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on human corneas from attachment to dispersal phase/ M.E. Zegans, R.N. Van Gelder // *Microorganisms.* — 2014. — Vol. 158. — P. 420 –422.
225. Zhang, C. Interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in conjunctiva of di-abetic patients with symptomatic moderate dry eye: case-control study / C. Zhang, L. Xi, S. Zhao // *BMJ Open.* — 2016. — Vol. 6. — P. 11-36.
226. Zhang, S. An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflam-matory bowel disease / S. Zhang, J. Ermann, M.D. Succi // *Sci Transl. Med.* — 2015. — Vol. 7. – P. 56-67.

227. Zhang, Y. Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells / Y. Zhang, R.A. Akhtar // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 1997. — Vol. 38. — P. 1139–1148.
228. Zhou, C. A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-L-lysine / C. Zhou, P. Li, X. Qi // *Biomaterials.* — 2011. — Vol. 32. — P. 2704–2712.
229. Zhou, Y. The conjunctival microbiome in health and trachomatous disease: a case control study / Y. Zhou, M.J. Holland, P. Makalo // *Genome Med.* — 2014. — URL: <https://doi.org/10.1186/s13073-014-0099-x>.