

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Ставропольский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Болатчиев Альберт Добаевич

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Батурин Владимир Александрович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Базиков Игорь Александрович

Ставрополь – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Постантибиотиковая эра – глобальная проблема антибиотикорезистентности	12
1.2. Антимикробные пептиды – перспективы практического применения.....	18
1.3. Синдром диабетической стопы и дефензины.....	31
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Клиническая часть исследования	39
2.2. Экспериментальная часть исследования	41
2.2.1. Антимикробные агенты.....	41
2.2.2. Бактериальные штаммы	42
2.2.3. Компьютерное моделирование.....	43
2.2.4. Атомно-силовая микроскопия	44
2.2.5. Метод серийных разведений.....	45
2.2.6. Приготовление ниосомальных дефензинов	48
2.2.7. Экспериментальная модель инфицированной раны	50
2.3. Статистическая обработка данных.....	53
Глава 3. СОСТАВ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АЭРОБНОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ЯЗВЕННО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ОЧАГОВ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ	54
3.1. Состав микроорганизмов, выделенных из язвенно-некротических очагов у пациентов с синдромом диабетической стопы	54
3.2. Антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы.....	56

3.3. Заключение.....	61
Глава 4. УРОВЕНЬ ДЕФЕНЗИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ	63
4.1. Заключение	65
Глава 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИСТАФИЛОКОККОВОЙ АКТИВНОСТИ ДЕФЕНЗИНОВ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>.....	67
5.1. Моделирование взаимодействия антимикробного пептида HNP-1 и компонента клеточной стенки бактерий – пептидогликана	67
5.2. Сравнительная характеристика влияния цефотаксима и HNP-1 на морфологические характеристики клеток <i>S. aureus</i> по данным атомно-силовой микроскопии	71
5.3. Оценка антистафилококковой активности HNP-1 и hBD-1 методом серийных разведений.....	80
5.4. Влияние ниосомальных дефензинов на скорость заживления инфицированных ран в эксперименте	85
5.5. Заключение.....	98
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ.....	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	119
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Прогрессирующее нарастание антибиотикорезистентности является глобальной угрозой человечеству, что отражено в международных документах Всемирной организации здравоохранения [205]. В Российской Федерации также принят ряд важнейших решений, направленных на обеспечение биологической безопасности страны, в том числе в связи с распространением антимикробной резистентности [1, 2].

Особенно ярко проблема антибиотикорезистентности проявляется при хроническом течении инфекционного процесса, например, у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС). Это связано с тем, что инфицированные язвы плохо поддаются лечению системными противомикробными средствами ввиду низкой чувствительности к препаратам, а также иммунодефицита и нарушений микроциркуляции при сахарном диабете [56]. Попытки усилить эффективность системной антибактериальной терапии с помощью местных противомикробных средств не всегда результативны [66]. В связи с этим фармакотерапия СДС требует комплексного подхода с использованием системных антибактериальных средств и применением противомикробных препаратов местного действия. При этом выбор средств терапии системного и местного действия должен опираться на результаты мониторинга состава микроорганизмов, выделяемых из язвенно-некротических очагов, а также на данные чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Таким образом, очевидна острая необходимость в поиске новых подходов к лечению СДС за счет разработки новых антибактериальных препаратов. Перспективными кандидатами на эту роль являются антимикробные пептиды – дефензины, обладающие широким спектром антибактериальной,

противогрибковой и противовирусной активности [176], к которым у бактерий не формируется резистентность [147].

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

Степень научной разработанности проблемы

Снижение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам приводит к увеличению продолжительности лечения, увеличению летальности, а также финансовых затрат [164]. Рациональная антибиотикотерапия обеспечивается путем постоянного мониторинга изменений состава и антибиотикочувствительности патогенов, а научная разработанность данной проблемы в большинстве регионов России остается недостаточно высокой, что связано с отсутствием данных по локальной антибиотикорезистентности у пациентов с СДС.

Рост антибиотикорезистентности определяет высокую потребность в новых противомикробных препаратах [26]. Однако за последние 10 лет на фармацевтический рынок было выведено всего лишь несколько новых антимикробных средств [45].

Предшествующие попытки разработать антибиотики на основе антимикробных пептидов либо потерпели неудачу в связи с быстрым разрушением пептидов ферментами, либо так и не были выпущены на фармацевтический рынок в связи с дороговизной производства [54, 158].

Спектр противомикробной активности дефензинов достаточно изучен [147], однако не полностью исследован характер их бактерицидного действия на микроорганизмы, а также недостаточно данных по их эффективности при совместном применении с бета-лактамами антибиотиками. Остается нерешенной проблема быстрой деградации дефензинов, что снижает их продолжительность действия.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. У больных с СДС исследовать состав микроорганизмов, выделенных из язвенно-некротических очагов.
2. Изучить чувствительность микроорганизмов при СДС к противомикробным препаратам.
3. Определить уровень антимикробных пептидов α -дефензина-1 (HNP-1) и β -дефензина-1 (hBD-1) в крови у больных с СДС до и после проведенного лечения.
4. Исследовать характер противомикробного действия дефензинов на клетки золотистого стафилококка с помощью методов компьютерного моделирования и атомно-силовой микроскопии.
5. Определить минимальные подавляющие концентрации дефензинов HNP-1 и hBD-1, а также их противомикробный эффект в комбинации с бета-лактамами антибиотиками в отношении клинических штаммов *S. aureus*, выделенных из диабетических язв.
6. Разработать лекарственные формы для наружного применения, содержащие HNP-1 и hBD-1, и исследовать их действие в модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс.

Научная новизна

Впервые за последние 10 лет исследованы локальные данные (г. Ставрополь) состава и антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных у пациентов с СДС. Необходимость изучения локальных и региональных данных определяется значительными отличиями в составе патогенов и их

чувствительности к противомикробным препаратам в разных регионах и лечебных учреждениях [21, 25]. По сравнению с локальными данными десятилетней давности [11], показано, что ведущим микроорганизмом при СДС по-прежнему является золотистый стафилококк, однако доля метициллин-резистентных штаммов увеличилась до 42,5%.

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

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

Методология и методы исследования

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

Компьютерное моделирование выполнялось с применением современного программного обеспечения (HyperChem v.8 и Auto Dock v.4). Атомно-силовая микроскопия проводилась по общепринятой методике пробоподготовки [37] с

использованием микроскопа NTegra Life (NT-MDT, Россия) с программным обеспечением Nova Pх 3.4.

Микробиологические исследования (идентификация микроорганизмов, определение антибиотикочувствительности, исследование минимальных подавляющих концентраций, эксперименты с совместным использованием антимикробных пептидов и цефотаксима с целью изучения эффектов антагонизма и синергизма) были выполнены в соответствии с указаниями МУК 4.2.1890-04 и стандартами Европейского комитета по определению антимикробной чувствительности [20, 29, 129].

Все эксперименты на животных были выполнены в соответствии с принципами Женевской конвенции 1985 года о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларацией 2000 года о гуманном отношении к животным, а также одобрены Этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (протокол заседания Этического комитета №52 от 16.12.2015).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в соответствии с правилами научных исследований с определением нормальности распределения и применением параметрических и непараметрических статистических критериев в программном обеспечении MaxStat Pro 3.6.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При синдроме диабетической стопы у пациентов, находящихся на стационарном лечении, в составе раневой микрофлоры преобладают штаммы *Staphylococcus aureus*; доля метициллин-резистентных штаммов составляет 42,5%.
2. У пациентов с СДС уровень дефензинов HNP-1 и hBD-1 в крови снижается на фоне хирургического лечения и/или фармакотерапии.

3. Дефензин HNP-1 оказывает бактерицидное действие на клинические штаммы *S. aureus*, создавая линейные разрывы по всей длине микробных клеток.
4. Дефензины HNP-1 и hBD-1 *in vitro* обладают выраженной противомикробной активностью в отношении MSSA и MRSA. Противомикробное действие бета-лактамов антибиотиков (цефотаксима) усиливается при их совместном применении с дефензинами в отношении MSSA.
5. Гели с инкапсулированными в кремнийорганические наноконтейнеры HNP-1 и hBD-1 являются перспективными для дальнейших доклинических исследований в качестве новых противомикробных и ранозаживляющих препаратов для наружного применения.

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

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

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

Структура и объем работы

Материалы диссертационного исследования изложены на 147 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список использованной литературы включает 207 источников: 38 отечественных и 169 зарубежных. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 13 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Постантибиотиковая эра – глобальная проблема антибиотикорезистентности

Как известно, в настоящее время отмечается стремительный и повсеместный рост устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, что представляет собой серьезную проблему и вызов современной медицине [10, 25, 26]. Угроза растущей антибиотикорезистентности и способы борьбы с ней активно обсуждаются на уровне Всемирной организации здравоохранения и Организации Объединенных Наций – в 2016 году был опубликован «Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам» [205]. Согласно данному документу ключевыми задачами по борьбе с обозначенной проблемой является оптимизация использования противомикробных препаратов, а также разработка новых лекарственных средств. Кроме того, в 2017 году Правительством Российской Федерации была утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года [2], согласно которой были выделены следующие цели и задачи:

- Целью Стратегии является предупреждение и ограничение распространения антимикробной резистентности на территории Российской Федерации.

Для достижения цели Стратегии необходимо решить следующие задачи:

- информирование населения по вопросам применения противомикробных препаратов и проблемам антимикробной резистентности;
- повышение уровня подготовки специалистов в соответствующих отраслях по вопросам, связанным с антимикробной резистентностью, включая

рациональное применение противомикробных препаратов, химических и биологических средств, в том числе средств защиты растений;

- совершенствование мер по предупреждению и ограничению распространения и циркуляции возбудителей с антимикробной резистентностью;
- обеспечение системного мониторинга распространения антимикробной резистентности;
- изучение механизмов возникновения антимикробной резистентности;
- разработка противомикробных препаратов и альтернативных методов, технологий и средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний человека, животных и растений;
- совершенствование мер по осуществлению контроля за оборотом противомикробных препаратов, химических и биологических средств;
- обеспечение межведомственного взаимодействия и развитие международного сотрудничества в области предупреждения и ограничения распространения антимикробной резистентности.

Актуальность данной проблемы еще более ярко проявляется при рассмотрении графика внедрения в клиническую практику новых противомикробных средств (Рисунок 1) – в последнее время в данной области фармацевтики наблюдается «вакуум изобретений», так как за последние 10 лет на фармацевтический рынок было выведено всего лишь несколько новых антибактериальных препаратов (АБП) [45].

Снижение чувствительности микроорганизмов естественным образом приводит к снижению эффективности противомикробной терапии и как следствие – увеличению продолжительности лечения, увеличению летальности, а также финансовых затрат на лечение [71, 164]. Так, к примеру, в США ежегодно погибают 19 тысяч человек от инфекций, вызванных MRSA [73], причем финансовые затраты, связанные с лечением данной инфекции, ежегодно составляют 3 миллиарда долларов США. По данным последнего доклада Центра

по контролю и профилактике заболеваний (США), финансовое бремя, связанное с растущей микробной резистентностью, составляет около 20 миллиардов долларов США и 8 миллионов дополнительных койко-дней [76].

Год открытия	Препарат/группа препаратов
1928	Пенициллин
1932	Сульфаниламиды
1943	Аминогликозиды
1945	Тетрациклины
1946	Нитрофураны
1947	Полимиксины, фениколы
1948	Цефалоспорины
1952	Макролиды
1953	Гликопептиды, нитроимидазолы, стрептограминны
1957	Рифамицины
1961	Триметоприм
1962	Хинолоны, линкозамиды, фузидовая кислота
1969	Фосфомицин
1976	Карбапенемы
1978	Оксазолидиноны
1978	Монобактамы
1987	Липопептиды
1990	"Вакуум изобретений"
2000	
2010	

Рисунок 1. История открытия противомикробных препаратов [173].

Аналогичная ситуация наблюдается и в России – отмечается рост устойчивости возбудителей большинства бактериальных инфекций к противомикробным препаратам [13, 21, 28, 36, 132].

По оценкам специалистов, к 2050 году от инфекций, вызванных резистентными штаммами, будет умирать более 10 миллионов человек ежегодно, причем к этому времени из-за данной проблемы мировая экономика потеряет около 100 триллионов долларов США [144].

Очевидно, что для успешной борьбы с растущей антибиотикорезистентностью требуются разработка новых антимикробных препаратов, а также их скорейшее внедрение в клиническую практику. В этой связи Всемирная организация здравоохранения 27 февраля 2017 года опубликовала документ «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics» – список глобально приоритетных резистентных бактерий, требующих исследования и разработки новых антибактериальных средств [206]. В соответствии с данным документом было выделено три категории важности возбудителей, устойчивых к АБП:

1. Приоритет 1 – критически важные возбудители:
 - 1.1. *Acinetobacter baumannii*, не чувствительные к карбапенемам;
 - 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*, не чувствительные к карбапенемам;
 - 1.3. *Enterobacteriaceae* (в частности: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*), резистентные к карбапенемам и цефалоспорином III поколения.
2. Приоритет 2 – возбудители высокого уровня важности:
 - 2.1. *Enterococcus faecium*, резистентные к ванкомицину;
 - 2.2. *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентные (MRSA) и ванкомицин-резистентные (VRSA);
 - 2.3. *Helicobacter pylori*, резистентные к кларитромицину;
 - 2.4. *Campylobacter spp.*, резистентные к фторхинолонам;
 - 2.5. *Salmonella spp.*, резистентные к фторхинолонам;
 - 2.6. *Neisseria gonorrhoeae*, резистентные к цефалоспорином III поколения и фторхинолонам.
3. Приоритет 3 – умеренная степень важности:
 - 3.1. *Streptococcus pneumoniae*, не чувствительные к пенициллинам;
 - 3.2. *Haemophilus influenzae*, резистентные к ампициллину;
 - 3.3. *Shigella spp.*, резистентные к фторхинолонам.

Формирование резистентности обусловлено различными причинами и механизмами. Известно, что это закономерный эволюционный процесс адаптации микроорганизмов к постоянному контакту с веществами, обладающими противомикробными свойствами [126]. Повсеместное распространение антибиотикорезистентности обусловлено двумя факторами – мутациями и горизонтальным переносом генов [128].

Мутации, которые приводят к развитию резистентности к антимикробным препаратам, обычно возникают в трех типах бактериальных генов: 1) в генах, кодирующих мишени антибактериальных средств; 2) в генах, кодирующих транспортеры антибактериальных препаратов; 3) в генах, кодирующих регуляторные элементы, которые подавляют экспрессию транспортеров либо влияют на факторы инактивации антибиотиков (к таким регуляторным элементам относятся антибиотик-модифицирующие ферменты и эффлюксные насосы (от англ. efflux – выброс) [127].

Что касается горизонтального переноса генов, то, несомненно, данный фактор повсеместного распространения устойчивости к АБП не менее важен, чем мутации. В данном случае гены резистентности «приобретаются» патогенными бактериями от комменсальной микрофлоры человека либо от бактерий окружающей среды, чему в последнее время находится все больше подтверждений [60].

Специалисты, занимающиеся изучением механизмов антимикробной резистентности, выделяют несколько ключевых стратегий, позволяющих бактериям вырабатывать устойчивость к АБП:

1. Предотвращение доступа к мишени воздействия.
 - 1.1. Снижение проницаемости бактериальной стенки [44, 48, 106, 113, 181].
 - 1.2. Усиленный эффлюкс АБП [48, 75, 94, 102, 143].
2. Мутации в мишенях воздействия АБП [25, 99].

3. Модификация мишени воздействия АБП [48, 186].

4. Влияние на АБП.

4.1. Инактивация АБП с помощью гидролиза [27, 38, 62, 110, 155, 165, 199, 202].

4.2. Инактивация АБП с помощью модификации химических групп [141, 160].

Говоря об актуальности антибиотикорезистентности, нельзя не выделить такую проблему как формирование биопленок. Бактерии способны существовать в планктонной форме (то есть как индивидуальные, свободно живущие клетки), а также формировать структурированные микробные консорциумы, которые окружены полимерным матриксом, продуцируемым бактериальными клетками, данная форма существования микроорганизмов получила название биопленок, или «оседлых», сессильных форм [16, 86]. Также следует отметить, что биопленки могут как состоять из одного вида микроорганизмов (бактерий или грибов), так и иметь полимикробный состав (90% известных бактерий способны формировать биопленки). Кроме того, в состав полимерного матрикса могут входить компоненты «хозяина»: тромбоциты, фибрин и иммуноглобулины [92, 114]. В соответствии с клиническими рекомендациями Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) сессильные формы существования микроорганизмов обычно обнаруживаются в следующих клинических ситуациях [92]:

1. Инфекции, связанные с медицинскими устройствами:

1.1. Центральные и периферические сосудистые катетеры;

1.2. Эндотрахеальные трубки;

1.3. Мочевые катетеры;

1.4. Ортопедические импланты и суставные протезы;

1.5. Импланты молочных желез;

- 1.6. Протезы клапанов сердца, сосудистые трансплантаты, искусственные водители ритма;
2. Тканевые инфекции, при которых часто формируются биопленки:
 - 2.1. Хронические отиты и синуситы;
 - 2.2. Хронические тонзиллиты, ларингиты;
 - 2.3. Зубной налет;
 - 2.4. Эндокардиты;
 - 2.5. Инфекции нижних дыхательных путей, муковисцидоз;
 - 2.6. Мочекаменная болезнь;
 - 2.7. Инфекции желчевыводящих путей;
 - 2.8. Инфекции мочевыводящих путей;
 - 2.9. Остеомиелит;
 - 2.10. Вагинозы;
 - 2.11. Хронические раны (в частности, при синдроме диабетической стопы).

При вышеописанных состояниях иммунокомпетентные клетки хозяина окружают биопленки, однако факторы защиты и противомикробные средства не могут проникнуть вглубь полимерного матрикса, что приводит к формированию хронического инфекционного процесса [91]. Таким образом, несомненно, требуются поиск и исследование новых способов борьбы с формированием sessile форм существования бактериальных и грибковых патогенов.

1.2. Антимикробные пептиды – перспективы практического применения

Организм человека непрерывно контактирует с целым рядом непатогенных и патогенных микроорганизмов. В процессе эволюции сформировались механизмы защиты, позволяющие сначала идентифицировать патоген, а затем, при необходимости, осуществлять адекватный контроль его дальнейшего проникновения и распространения. Выполнение данных задач реализуется посредством системы врожденного иммунитета, способной (в отличие от системы

адаптивного иммунитета), немедленно распознавать и уничтожать инфекционные агенты различной природы [95]. Важнейшим компонентом врожденного иммунитета являются антимикробные пептиды (AMPs – antimicrobial peptides) длиной от 5 до ~100 аминокислотных остатков. Эти пептиды обладают широким спектром антимикробной активности в отношении различных инфекционных агентов: бактерий, вирусов, грибов и простейших. В настоящее время среди шести царств (бактерии, археи, протисты, грибы, растения и животные) идентифицировано более 3000 AMPs [187]. Разработана масштабная база данных – The Antimicrobial Peptide Database (APD), которая содержит информацию обо всех известных на сегодняшний день антимикробных пептидах: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>.

Первый антимикробный пептид млекопитающих был идентифицирован в лейкоцитах кролика в 1956 году и получил название «дефензин» (defensin) [89]. После этого в лизосомах лейкоцитов человека были также обнаружены различные AMPs [201]. Однако, по определению некоторых авторов, лизоцим также может быть отнесен к группе антимикробных пептидов (был исследован еще в 1922 Александром Флемингом [74]), имеющий ферментативную активность и способный разрушать пептидогликан в 1,4- β -связях [104]. После внедрения методов хроматографии и биоинформатики в восьмидесятых годах прошлого столетия начались масштабная идентификация и выделение множества AMPs [204]. Известно, что они являются первой защитной линией врожденного иммунитета, их экспрессируют как прокариоты (бактерии), так и эукариоты (простейшие, грибы, растения, насекомые и животные) [200]. Клетки кожи лягушки, например, вырабатывают более трехсот различных пептидов, обладающих противoinфекционной активностью [58]. Основными клетками-продуцентами AMPs у эукариот являются клетки эпителия, фагоциты и лейкоциты [81]. Некоторые из AMPs синтезируются конституционально, а экспрессия других стимулируется различными молекулами – к примеру, клетки линии HEK293

вырабатывают дефензины в ответ на стимулы, поступающие от бактериальных липополисахаридов [88].

Среди огромного количества антимикробных пептидов человека наиболее изученными являются дефензины (от англ. defensin, в некоторых источниках – дефенсины), которые представляют собой небольшие пептиды (29-42 аминокислотных остатка) молекулярной массой ~4-6 кДа, имеющие положительный заряд и обладающие выраженной противомикробной активностью [176]. Антимикробные пептиды суперсемейства дефензинов состоят из α -спиральной области, связанной с двухцепочечными антипараллельными доменами β -листа через три дисульфидные связи [195].

В зависимости от генетической структуры и дисульфидных связей данные антимикробные пептиды могут быть разделены на три класса: α -, β - и θ -дефензины. α -дефензины человека представлены следующими пептидами: HNP-1, HNP-2, HNP-3 и HNP-4 (сокр. от англ. human neutrophil peptides – нейтрофильные пептиды человека), которые продуцируются нейтрофилами, моноцитами, НК-клетками и Т-лимфоцитами; кроме того, к α -дефензинам относятся HD-5 и HD-6 (сокр. от англ. human defensin – дефензин человека) – продуцируются клетками Панета желудочно-кишечного тракта, где, по-видимому, защищают стволовые клетки кишечных крипт [81, 176].

β -дефензины человека – human beta-defensins (hBD) – продуцируются эпителиальными клетками слизистых оболочек урогенитального, респираторного и желудочно-кишечного трактов (сюда относятся hBD-1, hBD-2, hBD-3 и hBD-4) [171, 188, 197]. Кроме того, в последнее время были идентифицированы еще несколько антимикробных пептидов из класса β -дефензинов, которые были обнаружены в придатках яичка – hBD-5, hBD-6, hBD-14, hBD-18, hBD-23 и hBD-26, однако их функция остается неизученной [147]. Что касается θ -дефензинов, то у человека выявлены их мРНК, однако данные пептиды не экспрессируются ввиду наличия стоп-кодона (однако в некоторых случаях, при «игнорировании» стоп-

кодонов, может происходить трансляция белка, и образуются ретроциклины, имеющие противомикробную активность) [57, 93].

Несмотря на генетические отличия, все дефензины человека синтезируются *in vivo* по схожему сценарию: сначала происходит трансляция так называемого «большого» пре-пропептида (от англ. – pre-propeptide), который содержит около 100 аминокислотных остатков и состоит из N-концевого удлинения и пропептида. Пропептид, в свою очередь, состоит из продомена и C-концевой зрелой последовательности самого дефензина (около 35 аминокислотных остатков). Продомен ингибирует биологическую активность дефензина, выполняет функцию защиты клетки-продуцента и нужен для того, чтобы избежать аутоксичности [176]. Синтезированные α -дефензины (HNP-1-4) поступают в азурофильные гранулы, которые высвобождаются в фагоцитарные вакуоли, содержащие патогены. Более 40% из всех белков азурофильных гранул нейтрофилов приходится на α -дефензины [79, 80]. У здоровых лиц HNP-1-4 имеют очень низкие концентрации во внеклеточной жидкости – $3,54 \pm 2,97$ нг/мл [52]. При сепсисе и бактериальном менингите уровень данных антимикробных пептидов в плазме может повышаться до 0,17 мг/мл [148] – это является следствием дегрануляции нейтрофилов, их лизиса и/или утечки содержимого при формировании фагосом [185]. В то время как HNP-1-4 в «изобилии» и постоянно экспрессируются нейтрофилами, базальная продукция других α -дефензинов – HD-5 и HD-6 – модулируется в ответ на инфекции, передаваемые половым путем [156], либо их уровень снижается за счет активации Wnt-сигнального пути (активация транскрипционного фактора TCF4 при болезни Крона) [192]. Что касается β -дефензинов, то hBD-1 экспрессируется постоянно во всех типах эпителиальных клеток [105], а синтез hBD-2 и hBD-3 индуцируется в ответ на инфекционные стимулы (от бактерий, грибов и вирусов) и на провоспалительные цитокины (интерлейкин- 1β и фактор некроза опухоли- α) [175]. Также было показано, что ретиноевая кислота может полностью подавлять синтез β -дефензинов в кератиноцитах за счет ингибирования транскрипционного фактора AP-1 – эти

данные демонстрируют, что баланс между метаболитами витамина А и провоспалительными цитокинами может иметь большое значение в регуляции экспрессии данного класса антимикробных пептидов [87]. Уровень hBD-1 в крови у здоровых лиц составляет 8,85 нг/мл (от 7,46 до 9,69 нг/мл) [98].

Дефензины являются модуляторами воспаления и активаторами адаптивного иммунного ответа. Данные антимикробные пептиды напрямую стимулируют миграцию иммунных клеток, способствуют высвобождению провоспалительных цитокинов и активируют антигенпрезентирующие клетки в направлении Th1-иммунного ответа – тем самым дефензины являются эффективным связующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом [34, 176]. Кроме CCR6-опосредованного хемотаксического эффекта в отношении дендритных клеток, β -дефензины обеспечивают миграцию моноцитов/макрофагов, причём hBD-2- и hBD-3-зависимый хемотаксис опосредован CCR2-рецепторами [163]. α -дефензины *in vitro* также демонстрируют себя как хемокины – в присутствии HNP-1, HNP-3 и HD-5 усиливалась миграция макрофагов, Т-лимфоцитов и незрелых тучных клеток [83]. β -дефензины, помимо хемотаксического эффекта в отношении антигенпрезентирующих клеток, способны также напрямую индуцировать активацию данных клеток путем усиления экспрессии HLA-комплексов и костимулирующих молекул – CD80 и CD86; а hBD-3 активирует дендритные клетки и моноциты путем стимуляции TLR1/2-MyD88-сигнального пути, без участия рецепторов CCR6 и CCR2 [77]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что α - и β -дефензины могут действовать как провоспалительные молекулы – помимо мобилизации дендритных клеток и макрофагов, данные пептиды вызывают секрецию цитокинов клетками воспаления. К примеру, hBD-1-3 вызывают массивный выброс интерлейкина-6, интерлейкина-8 и CCL2 (сокр. от англ. C-C motif ligand 2, является мощным фактором хемотаксиса моноцитов) [49], а HD-5, стимулируя эпителий кишечника, приводит к высвобождению провоспалительных молекул: интерлейкина-2, интерлейкина-8, фактора некроза опухоли- α , CCL20 (фактор хемотаксиса лимфоцитов и нейтрофилов); кроме того,

данный дефензин обладает проапоптотическим действием на эпителиальные клетки кишечника и CD4⁺ Т-лимфоциты [124]. Говоря об иммуномодулирующих свойствах дефензинов, следует отметить, что в исследованиях *in vitro* HNP-1 и hBD-2 в концентрации 10 мкг/мл способны активировать систему комплемента, взаимодействуя с фактором C1q [31]. В мышинной модели колита (колит, индуцированный декстраном сульфата натрия) введение HNP-1 приводило к инфильтрации кишечника макрофагами и лимфоцитами. Более того, в культуре клеток толстой кишки, полученной от этих мышей, были выявлены высокие уровни γ -интерферона, фактора некроза опухоли- α и интерлейкина 1 β [53]. Иммуностимулирующие свойства дефензинов могут быть использованы для получения вакцин. Так, Ворожцова Е.В. и коллеги продемонстрировали, что дефензин-2 β запускает синтез антител в ответ на введенную ДНК-вакцину, кодирующую антиген Gag вируса иммунодефицита человека, данные результаты позволяют получать иммуноглобулины к ДНК-вакцинам, а также к гипотетическим белкам (существование которых предполагается по данным транскриптомного анализа) [14].

Так как наружная поверхность всех бактерий имеет отрицательный заряд (за счет присутствия липополисахаридов и/или тейхоевых кислот), положительно заряженные и гидрофобные антимикробные пептиды (в частности, α - и β -дефензины) неспецифически «накапливаются» на поверхности как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. На протяжении многих лет считалось, что антибактериальная активность дефензинов связана лишь с пермеабиллизацией (повышение проницаемости мембран клеток) – дефензины, словно таран, пробивают стенку бактерий, что приводит к лизису и гибели микробов [147]. Однако в последнее время для некоторых дефензинов были обнаружены и альтернативные механизмы противомикробного действия [18, 24]:

1. Модель «бочка-посох», при которой AMPs формируют димеры или мультимеры и пересекают мембрану бактерий, образуя в ней бочкообразные (цилиндрические) поры [130].

2. Образование тороидальных пор – при данной модели катионные пептиды соединяют наружный и внутренний слои липидов мембраны, формируя монослой, ведущий к образованию пор [136].
3. Модель «ковра»: AMPs располагаются параллельно наружной поверхности микробных клеток и при достижении пороговой концентрации образуются мицеллы, после чего липидная мембрана разрушается [145].
4. «Погружающиеся плоты» и электропорация – модель, при которой AMPs могут связываться с мембраной и погружаться в ее структуру либо создавать электрический потенциал, достаточный для образования пор [55, 61].

Среди антимикробных пептидов наибольший практический интерес представляют HNP-1 и hBD-1 [147], что обусловлено их широким спектром противомикробной активности и разнообразием биологических эффектов.

HNP-1 (α -дефензин-1), по данным APD, состоит из 30 аминокислотных остатков: ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC. α -дефензин-1 является катионным пептидом и обладает антибактериальной, противовирусной, фунгицидной и антипаразитарной активностью [147]. Разнообразный спектр противомикробной активности данного дефензина представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Спектр противомикробной активности HNP-1 [147]

Антибактериальная активность	Противовирусная активность	Противогрибковая активность
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Lysteria monocytogenes</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> .	Вирусы иммунодефицита человека, вирусы простого герпеса (1 и 2 типа), цитомегаловирусы, аденоассоциированные вирусы, аденовирусы, папилломавирусы человека, вирусы гриппа.	<i>Candida spp.</i>

Следует отметить, что, по данным APD, минимальная подавляющая концентрация (МПК) HNP-1 в отношении *S. aureus* составляет 0,5 – 2,5 мкг/мл. Помимо пермеабиллизации мембраны, в отношении стафилококков было показано, что данный антимикробный пептид способен ингибировать липид II, являющийся предшественником в синтезе клеточной стенки [117]. Кроме того, в исследовании *in vivo* было показано, что α -дефензин-1 обладает способностью нейтрализовать летальный токсин возбудителя сибирской язвы – через пять суток после инфицирования выживаемость в группе получавшей HNP-1 составила 100% [101]. Помимо способности инактивировать летальный токсин (путем димеризации), также было показано, что данный дефензин защищает макрофаги от гибели, индуцированной эндоспорами *Bacillus anthracis* и непосредственно подавляет образование этой формы существования возбудителя сибирской язвы [72]. Одним из серьезных осложнений после использования АБП является возникновение псевдомембранозного колита, вызванного *Clostridium difficile*. Для лечения данного заболевания в арсенале врачей имеется лишь два противомикробных препарата – метронидазол и ванкомицин [25]. Учитывая широкий антимикробный спектр

действия HNP-1, а также то, что другой α -дефензин – HD-5 – продуцируется слизистой оболочкой кишечника, было проведено исследование, которое показало, что оба дефензина в диапазоне концентраций 0,3-7 микромоль эффективно убивают даже гипервирулентные штаммы *C. difficile*. Аналогичные результаты были получены в отношении кишечной палочки и энтерококков (*Enterococcus faecalis*). Данные дефензины вызывали деполяризацию и фрагментацию мембраны всех трех микроорганизмов. Полученные данные могут быть использованы в клинической практике для лечения и профилактики данных инфекций; также предполагается, что HD-5, экспрессируясь в слизистой оболочке тонкого кишечника, играет роль сдерживающего фактора в развитии *C. difficile*-ассоциированной инфекции [78]. Проводятся интересные исследования по изучению противотуберкулезной активности дефензинов: *in vitro* было показано, что HNP-1 активен в отношении *Mycobacterium tuberculosis* (МПК имела диапазон от 2,5 до 25 мкг/мл) [64]. В экспериментальной модели туберкулеза совместное применение HNP-1, изониазида и рифампицина демонстрирует синергизм действия – использование противотуберкулезных средств без α -дефензина-1 менее эффективно, чем в комбинации с данным пептидом [97]. Говоря о перспективах применения HNP-1 в качестве противотуберкулезного препарата, следует учитывать, что его высокая активность в отношении *M. tuberculosis* обусловлена не только непосредственным киллингом микобактерий, но и высокой иммуномодуляторной активностью (например, хемотаксисом Т-клеток и моноцитов в очаг воспаления) [97].

Что касается противовирусной активности α -дефензина-1, то обращает на себя внимание разнообразие спектра (Таблица 1) и механизма противовирусного действия – HNP-1 способен действовать на различные стадии жизненного цикла вирусов. К примеру, данный пептид способен инактивировать вирус простого герпеса первого типа за счет связывания с вирусной оболочкой (суперкапсидом) [59]. Также было показано, что HNP-1 связывается с вирусной оболочкой вируса иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1), однако приводит ли это к повреждению

вирусных частиц, до сих пор не установлено; в том же исследовании было продемонстрировано, что α -дефензин-1 останавливает репликацию вируса за счет ингибирования связывания ВИЧ-1 с рецепторами CCR5 и CXCR4 (причем противовирусная активность HNP-1 наблюдается как до добавления вируса в клеточную линию, так и через 12 часов после инфицирования); более того, данный пептид *in vitro* снижает экспрессию рецептора CXCR4 – таким образом, в физиологических концентрациях HNP-1 обладает антиретровирусной активностью, влияя на различные звенья инфекционного процесса [170]. Нельзя не отметить, что этот антимикробный пептид обладает способностью связывать антигены ВИЧ – gp41 и gp120, а также клеточный рецептор CD4, тем самым блокируя способность вируса проникать в клетки [196]. Очевидно, что дефензины играют важную роль в противовирусном иммунитете, что подтверждается различными исследованиями: у пациентов, инфицированных ВИЧ, уровень α -дефензинов, продуцируемых миелоидными дендритными клетками, достоверно выше, чем у здоровых лиц; также уровень данных дефензинов имеет положительную корреляцию с уровнем CD4+Т-клеток – таким образом, чем выше уровень пептидов HNP-1-3, тем медленнее прогрессирует ВИЧ-инфекция [162]. В другом исследовании изучались концентрации α - и β -дефензинов в крови при вирусном гепатите С – было показано, что при данной инфекции уровень антимикробных пептидов превышает нормальные значения в 2-105 раз: концентрация α -дефензинов была в диапазоне от 31,2 до 1398 нг/50 мкл (у здоровых лиц – $13.5 \pm 1,5$ нг/50 мкл), а уровень β -дефензинов плазмы определялся в диапазоне 44,50-1056,11 нг/50 мкл (в контрольной группе – $2,88 \pm 0,14$ нг/50 мкл) [131]. Обращает на себя внимание и фунгицидная активность HNP-1, действующего на *Candida spp.* – в данном случае механизм противомикробного действия связан с влиянием на энергетический метаболизм – α -дефензин-1 истощает внутриклеточный аденозинтрифосфат и увеличивает внеклеточную концентрацию данной молекулы, что приводит к гибели грибов [67].

Обращает на себя внимание и противоопухолевая активность α -дефензина-1, при использовании которого в модели рака груди у мышей (линия 4T1) было показано уменьшение размеров опухоли и ее метастазирования. Кроме того, HNP-1 увеличивал чувствительность опухоли к доксорубину, что потенциально может быть использовано в клинической практике для увеличения эффективности химиотерапии [189].

Другой представитель дефензинов – β -дефензин-1 (hBD-1) – состоит из 36 аминокислотных остатков и имеет следующую аминокислотную последовательность: **DHYNCSVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK** (сведения из базы данных APD). Спектр противомикробного действия данного антимикробного пептида представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Спектр противомикробной активности hBD-1 [147]

Антибактериальная активность	Противовирусная активность	Противогрибковая активность
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Полиомавирусы, вирусы гриппа.	<i>Candida spp.</i>

β -дефензин-1 является барьером, защищающим эпителиальные клетки от инфицирования; его противомикробная активность немного слабее, чем у других β -дефензинов, однако при разрушении дисульфидных мостиков бактерицидная активность hBD-1 возрастает – редукция дисульфидных связей *in vivo* обеспечивается за счет действия тиоредоксинов (оксидоредуктаз, присутствующих на эпителиальных оболочках) [169]. Также было показано, что данный дефензин способен стимулировать нейтрофилы к выбросу внеклеточных ловушек, которые «захватывают» *S. aureus*; причем данный защитный механизм срабатывает благодаря стимулам от стафилококкового токсина [108]. Секреция β -дефензинов hBD-1-3 возрастает при бронхолегочных инфекциях – исследования *in vitro* показывают, что при инфицировании клеток альвеолярного эпителия (клеточная линия A549) возбудителями туляремии (*Francisella spp.*) hBD-1 и hBD-2 проявляют

высокую антибактериальную активность [72]. Большой интерес представляет противомикробное действие hBD-1 в отношении *Salmonella spp.*, в особенности активность против возбудителей брюшного тифа (*Salmonella enterica* серовар Typhi) – Maiti и коллегами было продемонстрировано, что β -дефензин-1 убивает бактерии (следует подчеркнуть, что кроме сальмонелл в данном исследовании изучали антибактериальную активность и в отношении MRSA и кишечной палочки), начиная с концентрации 0,1 мкг/мкл (максимальный эффект *in vitro* достигался при увеличении концентрации hBD-1 до 0,6 мкг/мл и при комбинации с hBD-2) – полуметальная доза hBD-1 (уничтожение 50% бактерий) *in vitro* составила 0,38, 0,36 и 0,66 мкг/мл соответственно для *S. Typhi*, *E. coli*, и *S. aureus* (MRSA); более того, в экспериментальной модели брюшного тифа на мышах выживаемость животных, получавших hBD-1, была достоверно выше, чем в контрольной группе, через 110 часов после инфицирования в контрольной группе летальность составила 100%, а в опытной группе (100 мкг β -дефензина-1) погибло лишь 25% животных [125]. Механизм противовирусной активности hBD-1 основан на блокировании проникновения вирусов в клетки макроорганизма [65], а противогрибковая активность достигается путем пермеабиллизации мембраны [109]; причем минимальная фунгицидная концентрация в отношении *Candida albicans* составляет 7 микромоляр.

Однако, несмотря на большое количество известных биологических свойств, на сегодняшний день недостаточно сведений о механизме бактерицидного действия дефензинов. В этой связи представляется перспективным поиск новых мишеней, с которыми могли бы взаимодействовать антимикробные пептиды. Одной из вероятных мишеней является пептидогликан, являющийся важнейшим компонентом клеточной стенки бактерий [35]. Для проверки данной гипотезы отлично подходят методы компьютерного моделирования лиганд-белковых комплексов (или так называемые алгоритмы докинга), которые находят применение при разработке новых лекарственных препаратов. Молекулярный докинг может применяться для моделирования взаимодействия между двумя молекулами на атомном уровне, что позволяет характеризовать поведение

исследуемых веществ в сайтах их связывания между собой, а также исследовать фундаментальные биохимические процессы [133].

Более того, взаимодействие дефензинов с бактериями, в частности – с пептидогликаном, должно приводить к изменениям клеточной поверхности, что может быть оценено с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), представляющей собой уникальный способ визуализации биологических объектов. Данный метод исследования позволяет провести высокоточное исследование морфометрических параметров микроорганизмов, досконально анализировать взаимодействие молекул с поверхностью микроорганизмов, изучать физико-химические свойства, измерять ригидность и исследовать адгезивные свойства поверхности бактерий [140]. Более того, АСМ дает возможность получить трехмерные изображения различных биологических объектов [46]. Первый атомно-силовой микроскоп был разработан Бинингом и коллегами в 1986 году [46]. Техника получения изображений, лежащая в основе работы атомно-силовых микроскопов, не похожа на обычные микроскопы, которые формируют изображения, захватывая свет или электроны с поверхностей. Основным принцип АСМ заключается в силовом взаимодействии между зондом и поверхностью. Датчики, представляющие собой упругую консоль (кантилевер) с острым зондом на конце, регистрируют это силовое взаимодействие; сила, действующая со стороны поверхности на зонд, приводит к возникновению изгиба кантилевера; регистрация величины этого изгиба позволяет точно контролировать силу взаимодействия зонда с поверхностью. Принцип работы атомно-силового микроскопа схематично представлен на рисунке 2.

АСМ позволяет получать высокое пространственное разрешение объектов, находящихся в привычных для них условиях, что особенно важно при исследовании микроорганизмов [23].

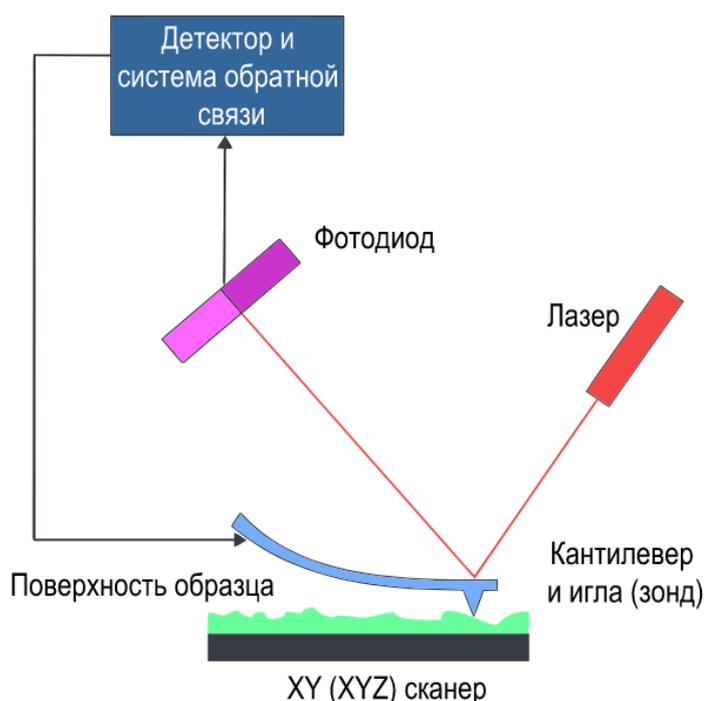


Рисунок 2. Принцип работы атомно-силового микроскопа.

1.3. Синдром диабетической стопы и дефензины

Одним из ярчайших примеров проблемы антибиотикорезистентности являются гнойно-некротические формы синдрома диабетической стопы (СДС); по оценкам Международной федерации диабета (International Diabetes Federation), на сегодняшний день около 400 миллионов человек страдает сахарным диабетом, причем к 2035-2040 гг. эта цифра достигнет 600 миллионов человек [184]. При сахарном диабете риск развития инфекций стоп составляет 25%, и это является наиболее частой причиной госпитализаций у данной категории больных [149]. СДС является самой распространенной причиной ампутаций нижних конечностей, число которых выше в 35 раз по сравнению с лицами без диабета [183]. Более того, инфекции стоп при СДС несут в себе огромное экономическое бремя – по оценкам специалистов, только в США на лечение данного заболевания ежегодно расходуется от 6,6 до 18,7 миллиарда долларов; причем общие затраты на лечение всех язвенно-раневых процессов, вызванных самыми разнообразными причинами (язвы при хронической артериальной и венозной недостаточности, синдром диабетической стопы, кожные заболевания, кожные инфекции, хирургические раны, травматические раны), – от 28 до 96 миллиардов долларов США [142].

В основе патогенеза СДС лежат два ключевых механизма – нейропатия и сосудистые нарушения (ангиопатия и ишемия) – данные процессы напрямую связаны с гипергликемией, которая подавляет продукцию и активацию эндотелиальной синтазы оксида азота; кроме того, гипергликемия приводит к усиленному гликозилированию белков [40]. Высокий уровень глюкозы, дислипидемия, резистентность к инсулину и окислительный стресс могут приводить к повреждению клеток, эндотелиальной дисфункции и различным осложнениям, связанным с диабетом. Гипергликемия ингибирует образование оксида азота, блокируя активацию эндотелиальной синтазы оксида азота, что приводит к образованию активных форм кислорода (супероксид). Последний, под воздействием супероксиддисмутаза, превращается в перекись водорода, которая в присутствии ионов железа и меди переходит в высокореактивный и повреждающий гидроксильный радикал. Более того, супероксид способен сам напрямую связываться с оксидом азота (мощнейшим вазодилататором), таким образом снижая биодоступность последнего, что приводит к ограничению сосудорасширяющего эффекта. Нарушение функции эндотелия приводит не только к вазоконстрикции, но и агрегации тромбоцитов, аномальному росту интимы, воспалению и формированию атеротромбоза. В конечном итоге, данные процессы, протекая в мелких сосудах, питающих нервы, приводят к нейропатии [40, 41, 70]. Еще одним механизмом формирования нейропатии являются конечные продукты гликирования, образующиеся в результате реакции Майяра. Более того, гликированные белки и липопротеины играют важную роль в процессах атерогенеза и старения [68]. Нейропатия приводит к деформации стопы и/или ограниченной подвижности суставов, что ведет к повышенному давлению стопы и последующему образованию кожных мозолей над точками давления. Кожные мозоли дополнительно увеличивают локальное давление, что в сочетании с необнаруженными повторными повреждениями приводит к локальному повреждению ткани, воспалению, некрозу и, наконец, образованию язв [112].

Нарушения микро- и макроциркуляции у лиц с сахарным диабетом ухудшают течение язв, ишемия также является фактором, ухудшающим прогноз и увеличивающим число крупных ампутаций. Длительная воспалительная реакция в микроциркуляторном русле приводит к гиалинизации и утолщению мембран капилляров, что нарушает транспорт питательных веществ и активированных лейкоцитов между капиллярным просветом и интерстицием. Кроме того, относительно неупругие капиллярные стенки объясняют ограниченную способность к вазодилатации в ответ на местную травму, что приводит к функциональной ишемии [69, 174]. Как только развивается язва, сразу же увеличивается восприимчивость к инфекциям, что связано с потерей естественных защитных барьеров. При хронических язвах стоп микроорганизмы быстро агрегируют и зачастую формируют биопленки, что значительно снижает чувствительность инфекционных агентов к противомикробным средствам – в конечном итоге это, в лучшем случае, значительно увеличивает длительность заживления дефекта, а в худшем – приводит к возникновению хронического воспаления и рецидивирующих инфекций, связанных с высвобождением микробов из биопленок [151].

В соответствии с клиническими рекомендациями по диагностике и лечению СДС [15], помимо хирургических манипуляций, важнейшим аспектом терапии трофических язв является контроль раневой инфекции, и при наличии активного инфекционного процесса (который характеризуется повышением температуры тела выше 38 °С, лейкоцитозом, гиперемией и гипертермией тканей в области поражения, гнойным отделяемым из раны) показано назначение системных АБП с учетом локальных и региональных данных антибиотикорезистентности микроорганизмов. Однако лечение поверхностных открытых язв без выраженных признаков воспаления подкожной клетчатки, может проводиться с помощью местных антимикробных препаратов и антисептиков [183].

Очевидно, что для адекватной антибиотикотерапии необходимо учитывать региональные данные по эпидемиологии микроорганизмов, выделяемых у

пациентов с гнойно-некротическими поражениями при сахарном диабете [26], однако повсеместный рост устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам требует поиска новых безопасных и эффективных соединений, обладающих противомикробной активностью, с целью разработки новых подходов к фармакотерапии этого тяжелого заболевания.

Сахарный диабет негативно влияет на нормальную функцию лейкоцитов и факторы врожденного иммунитета, снижая уровень иммунологической реактивности, что делает эту популяцию пациентов более восприимчивой к проникновению микроорганизмов через поверхностные раны в более глубокие ткани [115]. Было показано, что при данном заболевании обнаруживается ослабленный хемотаксис лейкоцитов, более того, при гипергликемии заметно ослабевает фагоцитарная и бактерицидная активность данных клеток [137].

Как было сказано ранее, ангиогенез играет большую роль в заживлении ран и язв, однако, с другой стороны, чрезмерная неоваскуляризация является одним из факторов «выживания» и адаптации опухолевых образований [176]. Недавние исследования показывают, что β -дефензины способны напрямую влиять на кровеносные и лимфатические эндотелиальные клетки – hBD-1, hBD-2 и hBD-4 стимулируют мобилизацию эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов, что реализуется посредством CCR6-зависимого рецепторного механизма (*in vitro*); в исследованиях *in vivo* также была продемонстрирована способность данных антимикробных пептидов индуцировать васкулогенез [177]. Так как заживление ран – это многоступенчатый процесс, включающий в себя воспалительный ответ, реэпителизацию и ангиогенез, то справедливо было высказано предположение, что дефензины являются краеугольным камнем данного процесса. Действительно, все больше находится подтверждений того, что, к примеру, β -дефензины в ране индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов, миграцию клеток и васкулогенез [166]. В подтверждение данной гипотезы говорит тот факт, что гипергликемия приводит к подавлению экспрессии β -дефензина-2 кератиноцитами [111].

Кожные покровы являются внешним защитным барьером и, таким образом, подвергаются воздействию большого числа различных патогенов. Следовательно, данный барьер должен иметь внушительный арсенал защитных механизмов. Помимо физического барьера, который препятствует проникновению микробов и в основном обеспечивается роговым слоем – самым внешним слоем кожи, эпидермис содержит огромное количество «иммунных стражей», которые активируются при проникновении патогенных микроорганизмов при нарушении целостности кожных покровов [43, 168]. На сегодняшний день известно, что основную функцию врожденного иммунитета кожи реализуют более 20 типов антимикробных пептидов [178]. Поскольку AMPs не только обладают антимикробными эффектами, но и способны усиливать и контролировать иммунные реакции, они способны активно поддерживать иммунный ответ, вызываемый патогенами. Все участки тела человека, которые контактируют с микробами, такие как эпителий кожи и слизистых оболочек, богаты AMPs для предотвращения колонизации тканей хозяина патогенными микроорганизмами [153, 178].

Было показано, что в очаге повреждения рекрутированные нейтрофилы и тучные клетки продуцируют AMPs, что приводит к стимуляции ангиогенеза и пролиферации кератиноцитов и последующему восстановлению поврежденной ткани [39, 116]. Продукция дефензинов может быть запущена и комменсальными бактериями, например, *S. epidermidis*, что проявляет себя прямой антимикробной активностью против стафилококков (в т. ч. и *S. aureus*) и косвенным действием – активацией TLR2 на кератиноцитах, запуская тем самым производство эндогенных AMPs и других иммунных реакций [168]. Кроме того, недавно было подтверждено, что и тучные клетки играют роль в иммунной защите против кожных инфекций, продуцируя кателицидины, которые, в свою очередь, привлекают в очаг воспаления нейтрофилы (содержащие HNP-1), что защищает от генерализации местного инфекционного процесса, вызванного грамположительной флорой [63].

Таким образом, идеальный препарат для лечения СДС должен, во-первых, уничтожать широкий спектр самых разнообразных патогенов, а во-вторых, обладать хемотаксическим, иммуномодулирующим и ранозаживляющим эффектами. Всем этим требованиям идеально соответствуют дефензины человека. Однако нативные антимикробные пептиды быстро разрушаются ферментами (протеолитический гидролиз), что снижает продолжительность их действия *in vivo*, но, как известно, различные биотехнологические методики позволяют модифицировать дефензины с целью улучшения их фармакологических свойств [147].

Гипотетически одним из перспективных способов защиты дефензинов от протеаз может являться инкапсулирование антимикробных пептидов в кремнийорганические наноконтейнеры – ниосомы. Среди всех доступных наноматериалов многочисленные исследования посвящены ниосомам ввиду их уникальных свойств – большой удельной поверхности, различной ширине пор, управляемым размерам частиц и хорошей биосовместимости [100, 190]. По сравнению с другими средствами доставки лекарственных средств кремнийорганические наноконтейнеры диаметром от 2 до 140 нм являются оптимальными кандидатами для применения в биомедицинских разработках: возможна модификация поверхности наночастиц для адресного распределения и сайт-специфического нацеливания [122]. Что касается их безопасности, то многочисленные исследования в целом демонстрируют, что ниосомы имеют относительно низкую токсичность: *in vitro* различная степень гемолиза определялась в дозах выше 200 мкг/мл; *in vivo* ниосомы хорошо переносились в дозах, превышающих 50–100 мг/кг [122]. К примеру, при сравнении острой токсичности ниосомальной и стандартной лекарственной форм доксорубина оказалось, что у первого препарата среднесмертельная доза равна $5,5 \pm 0,7$ для крыс и $4,0 \pm 0,6$ мг/кг для мышей, а у второго более чем в два раза выше – $14,2 \pm 1,2$ мг/кг и $10,8 \pm 1,0$ мг/кг, соответственно для крыс и мышей [9]. Более того, инкапсулирование препаратов в кремнийорганические наноконтейнеры позволяет

улучшить их проникновение в более глубокие слои кожи, а также увеличить их продолжительность действия за счет постепенного высвобождения лекарственных средств из наноносителей [7, 8].

Таким образом, проведенный обзор литературы демонстрирует важность поиска способов борьбы с антибиотикорезистентностью, что невозможно без изучения микробиологического пейзажа и разработки новых препаратов. В этой связи исследования антимикробных пептидов (в частности, дефензинов HNP-1 и hBD-1) в условиях патологического процесса у человека (при СДС) и разработки на основе полученных данных новых противомикробных средств для наружного применения, с целью усиления эффективности системной антибиотикотерапии, представляют большой фундаментальный и практический интерес.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Диссертационная работа состояла из клинической и экспериментальной частей. Общий план исследования представлен на рисунке 3.

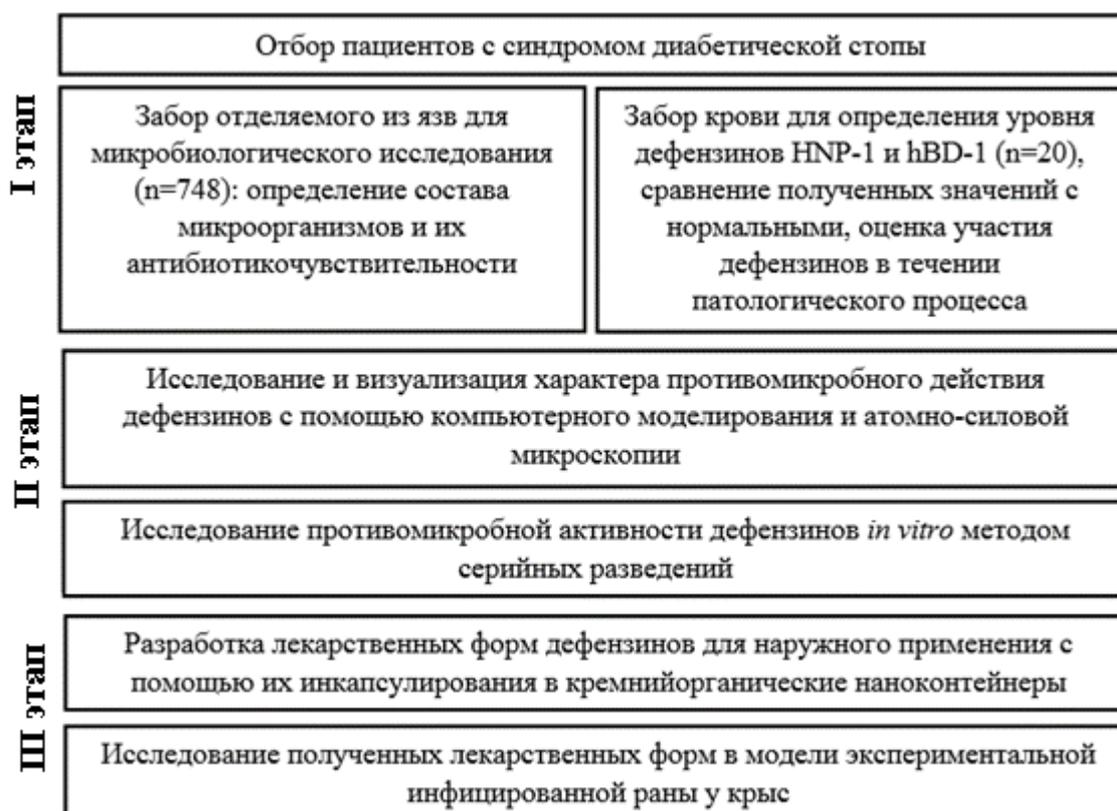


Рисунок 3. Общая схема диссертационного исследования.

2.1. Клиническая часть исследования

На первом этапе пациенты с СДС были обследованы с целью идентификации микроорганизмов, выделенных из диабетических язв, а также определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Кроме того, у некоторых пациентов были исследованы концентрации α - и β -дефенинов-1 (HNP-1 и hBD-1) в крови. Всего было обследовано 748 пациентов, госпитализированных в стационар в период с 2015 по 2018 год. У всех был установлен диагноз:

- Основной: сахарный диабет 2 типа.
- Осложнения: синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма.

Критерии включения в исследование:

- добровольное информированное согласие пациента;
- установленный диагноз «сахарный диабет 2 типа, осложненный синдромом диабетической стопы»;
- прием назначенных эндокринологом гипогликемических препаратов;
- возраст – старше 18 лет.

Критерии исключения из исследования (в том числе критерии недопуска к исследованию):

- отказ пациента от участия в исследовании;
- пациенты с психическими, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями;
- лица младше 18 лет;
- беременные и кормящие женщины.

Учет пациентов проводился в базе данных Microsoft Excel с соблюдением закона о врачебной тайне.

Все пациенты обследовались и получали лечение в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи и клиническими рекомендациями по диагностике и лечению сахарного диабета [4, 15] в рамках системы обязательного

медицинского страхования Российской Федерации (в этой связи выделение анаэробной микрофлоры не проводилось).

Выделение аэробной микрофлоры из гнойно-некротических очагов проводилось до назначения противомикробной терапии. Для анализа состава микроорганизмов и определения их чувствительности к антимикробным препаратам проводилась бактериологическая диагностика. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным средствам проводились в лаборатории клинической микробиологии ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 и стандартами Европейского комитета по определению антимикробной чувствительности (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) [20, 29, 129] с использованием диско-диффузионного метода: для идентификации микроорганизмов использовались тест-системы для биохимической идентификации бактерий «API» (BIOMÉRIEUX, Франция), «ММТЕ 24» (НПО Иммунотекс, Россия), для исследования антибиотикочувствительности применялись индикаторные диски с противомикробными препаратами производства ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (Россия).

Случайным образом было выбрано 20 пациентов с СДС (находились на стационарном лечении в период с 2016 по 2018 год), у которых было выполнено определение уровня HNP-1 и hBD-1 в крови, которое проводилось в иммунологической лаборатории ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» г. Ставрополя. Для этого у больных утром натощак осуществлялся забор крови из кубитальной вены (10 мл) при поступлении в стационар (до назначения антимикробных препаратов и проведения хирургического лечения) и перед выпиской (после проведенного лечения). Иммуноферментный анализ проводился с помощью использования наборов «ELISA Kit for Defensin Alpha 1» и «ELISA Kit for Defensin Beta 1» (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные данные

сравнивались между собой (до и после лечения), а также со значениями дефензинов у здоровых лиц (по литературным данным; в сравниваемых исследованиях использовалась аналогичная методика измерения уровня дефензинов).

2.2. Экспериментальная часть исследования

2.2.1. Антимикробные агенты

В диссертационном исследовании использовались следующие АБП: цефотаксим (порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного применения, ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь), мазь для наружного применения «Левомеколь» (ОАО «Нижфарм», Россия).

Цефотаксим, бета-лактамы АБП, полусинтетический цефалоспорин третьего поколения, обладает широким спектром противомикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Ингибирует синтез компонентов клеточной стенки (в частности, пептидогликана) за счет высокоаффинного взаимодействия с ПСБ [118]. В соответствии с исследованиями, а также инструкцией по применению цефотаксим обладает высокой активностью в отношении метициллин-чувствительных *S. aureus*, однако не действует на MRSA [51, 118]. Данный препарат (наряду с другими цефалоспорины третьего поколения) показан в качестве эмпирической противомикробной терапии СДС в стационаре [25, 26].

В соответствии с инструкцией по медицинскому применению мазь для наружного применения «Левомеколь», содержащая в своем составе два действующих вещества: метилурацил (диоксометилтетрагидропиримидин; 40 мг на 1 г; стимулятор репарации тканей) и противомикробный препарат хлорамфеникол (7,5 мг на 1 г), оказывает ранозаживляющее, а также антибактериальное действие (в отношении стафилококков, кишечной и синегнойной палочек) и используется в лечении инфицированных ран, являясь

одним из самых часто назначаемых препаратов для наружного применения в хирургической практике [17, 30].

Основываясь на проведенном обзоре литературы, для экспериментов *in vitro* и *in vivo* были выбраны два антимикробных пептида из группы дефензинов – рекомбинантный α -дефензин-1 (HNP-1) и рекомбинантный β -дефензин-1 (hBD-1) производства Cloud-Clone Corp., США; оба пептида выпускаются в сухом виде по 200 мкг в упаковке; пептиды были получены в прокариотической системе экспрессии (в культуре бактерий *E. coli*); дефензины хранились в соответствии с инструкцией: не более 12 месяцев при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до вскрытия упаковки и не более одного месяца после вскрытия упаковки при температуре $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Аминокислотная	последовательность	HNP-1:
ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC.		Аминокислотная
последовательность		hBD-1:
DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK.		

2.2.2. Бактериальные штаммы

В экспериментальной части исследования использовались два клинических штамма *S. aureus*, выделенных из язвенно-некротических очагов у пациентов с СДС: метициллин-чувствительный (MSSA) и метициллин-резистентный (MRSA) золотистый стафилококк. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным средствам проводились в лаборатории клинической микробиологии ООО «Центр клинической фармакологии и фармакотерапии» в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 и стандартами EUCAST [20, 29, 129]. Резистентность *S. aureus* к цефокситину считалась маркером *tesA*-опосредованной устойчивости к метициллину [129].

Таблица 3 – Фенотипическая характеристика штаммов *S. aureus*, использованных в экспериментальной части исследования

Штамм	Фенотип									
	FOX	CFX	CIP	CPT	DOX	ERY	GEN	LZD	MEM	VAN
MSSA	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
MRSA	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S

Примечание: FOX, цефокситин; CFX, цефотаксим; CIP, ципрофлоксацин; CPT, цефтаролин; DOX, доксициклин; ERY, эритромицин; GEN, гентамицин; LZD, линезолид; MEM, меропенем; VAN, ванкомицин; R, резистентный; S, чувствительный.

2.2.3. Компьютерное моделирование

Было проведено компьютерное моделирование взаимодействия HNP-1 и пептидогликана. Методами компьютерной химии с использованием программного обеспечения HyperChem v.8 выполнено моделирование пространственных структур α -дефензина-1 и пептидогликана, проведена геометрическая оптимизация, исследованы квантово-химические характеристики, а также распределение плотности заряда исследуемых молекул.

Молекулярные свойства HNP-1 и пептидогликана моделировались методом Монте Карло. Данный метод позволяет анализировать большое количество случайно генерируемых конфигураций молекулярных систем при заданной температуре (37 °C), на основании чего рассчитываются потенциальная энергия (ккал/моль), дипольный момент (Дебай) и среднеквадратичный градиент (ккал/(Å×моль)). Структуры HNP-1 и пептидогликана были получены из базы данных белков и нуклеиновых кислот PDB (Protein Data Bank). Для оценки эффекта взаимодействия HNP-1 с пептидогликаном выполнили геометрическую оптимизацию молекул методом молекулярной механики в программном обеспечении Auto Dock v.4. Этот метод рассматривает атомы как ньютоновские частицы, взаимодействующие друг с другом за счет задаваемых эмпирически потенциальных полей. Оптимизация геометрии молекул предусматривает поиск устойчивых состояний молекулярных структур, при которых потенциальная

энергия системы минимальна. Были изучены основные квантово-химические характеристики, и проведен молекулярный докинг, позволяющий определить ориентацию между молекулами и образование устойчивого комплексного соединения.

2.2.4. Атомно-силовая микроскопия

С целью изучения механизма действия антимикробных пептидов на микробные клетки была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ).

АСМ проводилась на базе НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика» центра биотехнологического инжиниринга СКФУ (г. Ставрополь). Использовался микроскоп NTegra Life (NT-MDT, г. Москва), полуконтактный режим. Использовались кантилеверы HA_NC *Etalon, Resonant frequency* 151 кГц, Force constant $3,5 \pm 20\% \text{ N/m}$, Curvature radius < 10 нм. Основные параметры сканирования: амплитуда колебаний кантилевера *Resonance* 11 единиц, начальная фаза его колебаний *Phase* 180° , скорость сканирования *Frequency* 0,47-0,51 Гц, коэффициент усиления цепи обратной связи *FB Gain* 0,15-0,17 единицы, *Set Point* 5,6 единиц. Анализ полученных изображений проводили при помощи прикладных программ Nova Pх 3.4.

Из свежей утренней культуры MSSA (штамм выделен у пациента с СДС) готовилась суспензия на стерильном физиологическом растворе, соответствующая стандарту мутности 0,5 по МакФарланду (то есть полученный раствор имел примерную концентрацию *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Полученные суспензии раскапывались в эппендорфы, в которые затем добавлялись антимикробные агенты – цефотаксим (концентрация 32 мкг/мл) и HNP-1 в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл; причем в качестве контроля использовались бактериальные суспензии, к которым вместо антимикробных агентов добавлялось аналогичное количество физиологического раствора. Затем суспензии инкубировались в термостате при 37°C , время инкубации – 5 и 20 мин (длительность инкубации была выбрана эмпирически). После инкубации бактериальные суспензии (~5 мкл) наносились на

поверхность свежесколотой слюдяной пластины, после чего они выдерживались в течение 2-3 мин, затем проводился смыв небольшим количеством дистиллированной воды, и сразу же проводилась сушка большим потоком сжатого воздуха при комнатной температуре. Затем в течение 16-20 ч образцы досушивались при комнатной температуре (20-22 °С), после чего проводилась АСМ с последующей компьютерной обработкой полученных изображений.

2.2.5. Метод серийных разведений

Изучение механизма действия антимикробного пептида HNP-1, проведенное с помощью атомно-силовой микроскопии и компьютерного моделирования, определило необходимость исследования противомикробной активности дефензинов *in vitro*. В соответствии с международными микробиологическими стандартами и рекомендациями по изучению новых антимикробных препаратов метод серийных разведений (или так называемый «метод шахматной доски») позволяет достоверно определять минимальную подавляющую концентрацию (МПК) исследуемого противомикробного агента, а также дает возможность оценивать МПК двух антимикробных веществ при одновременном воздействии на микроорганизм [134, 146]. Метод «шахматной доски» требует использования суспензий микробов в жидкой питательной среде; двукратные разведения изучаемых противоиных соединений производятся в пробирках (или в планшетах) во взаимно перпендикулярных плоскостях – то есть вещество А разводится в горизонтальном направлении, а вещество Б – в вертикальном. Таким образом, каждая отдельная пробирка (или лунка планшета) имеет два антимикробных агента (в различных концентрациях). Более того, данный метод исследования позволяет определить взаимное влияние комбинации веществ А и Б на изучаемый патоген – антагонизм, синергизм либо аддитивность действия двух антимикробных веществ [194].

Для исследования использовались выделенные от пациентов с СДС клинические штаммы *S. aureus*, для которых с помощью стандартного диско-диффузионного метода [29, 129] была определена чувствительность к АБП – в

соответствии с этим штаммы были разделены на метициллин-чувствительные (MSSA) и метициллин-резистентные (MRSA). Чистая культура микроорганизмов культивировалась на плотной питательной среде (маннитол-солевой агар Veston Dickinson) в течение 18–24 ч при 37°C. Из свежей утренней культуры готовилась суспензия на стерильном физиологическом растворе, соответствующая стандарту мутности 0,5 по МакФарланду – то есть полученная суспензия имела примерную концентрацию *S. aureus* $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, после чего 0,1 мл (100 мкл) данной суспензии растворялось в 9,9 мл 2,1% бульона Мюллера-Хинтона (SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Берлин, Германия), и в итоге получался раствор – инокулюм – содержащий примерно 5×10^5 КОЕ/мл, что соответствует стандартному протоколу EUCAST [120, 154] .

Затем в 96-луночный стерильный планшет с U-образным дном (планшет полистироловый с крышкой для иммунологических реакций однократного применения, ОАО "Фирма Медполимер", Санкт-Петербург, Россия) в каждую лунку вносилось 100 мкл инокулюма, после чего в лунки планшета вносились антимикробные агенты в различных концентрациях (от 0 мкг/мл и выше, с двукратным увеличением в каждой следующей лунке) – по 50 мкл каждого антимикробного вещества (вещества А и Б) – по осям ординат и абсцисс соответственно.

Для большей достоверности эксперимента проводился тройной контроль – по три лунки в каждом планшете, содержащие:

1. только 2,1% бульон Мюллера-Хинтона (200 мкл в лунку, без бактерий и без антимикробных агентов) – контроль-1;
2. только бактериальный инокулюм (200 мкл в лунку, без антимикробных агентов) – контроль-2;
3. только антимикробные агенты без инокулюма (100 мкл вещества А + 100 мкл вещества Б – всего 200 мкл в лунку) в максимальных концентрациях – контроль-3.

Для исследования методом серийных разведений в отношении клинических штаммов MSSA и MRSA, выделенных у пациентов с СДС, были выбраны следующие комбинации антимикробных агентов:

1. цефотаксим + HNP-1;
2. цефотаксим + hBD-1;
3. HNP-1 + hBD-1.

Антимикробные агенты растворялись в 2,1% бульоне Мюллера-Хинтона. Во всех экспериментах цефотаксим имел диапазон разведений от 0 до 32 мкг/мл; HNP-1 и hBD-1 – от 0 до 5 мкг/мл. Опыты с каждой парой антимикробных агентов повторялись не менее трех раз.

После добавления инокулюма и антимикробных агентов планшеты с закрытой крышкой (для предотвращения высыхания) инкубировались в термостате 18-20 часов при температуре 37 °С. На следующий день (спустя 18-20 часов) визуально оценивалось наличие/отсутствие роста (Рисунок 4), и на основании этого определялись величины МПК, и высчитывались параметры синергизма/антагонизма/аддитивного эффекта. За МПК бралось то значение концентрации противомикробного агента, при котором визуально полностью отсутствовал рост микроорганизмов (при соблюдении условий эксперимента, описанных выше) [194].

Комбинированный противомикробный эффект двух веществ (А и Б) оценивался по величине индекса фракционной подавляющей концентрации (иФПК). иФПК высчитывалась по формуле [167]:

$$\text{иФПК} = \frac{(A)}{(\text{МПК } A)} + \frac{(B)}{(\text{МПК } B)} \quad (1),$$

где А и Б – те концентрации антимикробных агентов в их смеси, которые подавляют рост бактерий, МПК А и МПК Б – соответственно, минимальные подавляющие концентрации веществ А и Б (без комбинации друг с другом).

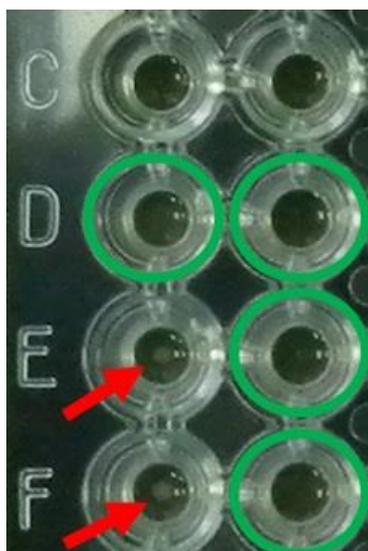


Рисунок 4. Визуальная оценка роста бактерий после инкубации с антимикробными агентами при использовании метода серийных разведений: красными стрелками указано наличие роста колоний *S. aureus*, зелеными окружностями обозначено отсутствие роста.

В зависимости от полученной величины иФПК выделяют четыре варианта взаимного влияния двух исследуемых антимикробных веществ на микроорганизмы [167]:

- иФПК $\leq 0,5$ – синергизм действия – вещества А и Б взаимно усиливают бактерицидный эффект друг друга;
- иФПК от 0,5 до 1 – аддитивное действие веществ А и Б – их бактерицидный эффект аддитивно складывается;
- иФПК выше 1 и до 2 – независимое действие – эффект исследуемых противоинфекционных веществ никак не зависит от присутствия друг друга;
- иФПК > 2 – антагонизм – вещества А и Б снижают антимикробный эффект друг друга.

2.2.6. Приготовление ниосомальных дефензинов

Результаты, полученные в исследовании методом серийных разведений, позволили подобрать несколько вариантов оптимальных концентраций дефензинов для приготовления лекарственных форм. Так как нативные антимикробные пептиды в силу своей химической природы быстро разрушаются

[147], для увеличения продолжительности их действия, а также с целью улучшения их фармакологических свойств была использована технология инкапсулирования активных веществ в кремнийорганические наноконтейнеры – так называемые ниосомы [9].

Для получения ниосом был использован ПЭГ-12 диметикон, обладающий амфифильными свойствами, что позволяет ориентироваться в дисперсии водорастворимой частью (полиэтиленгликолем) в воду и жирорастворимой частью (диметиконом) – в липиды. Эти свойства позволяют получать микрокапсулы при интенсивном встряхивании.

Точная навеска 1 мг дефензина (HNP-1 или hBD-1) – из расчета 1 мкг в 1 мл фармацевтического геля – растворялась при перемешивании в воде для инъекций. В полученный раствор поэтапно добавлялось 100 мл ПЭГ-12 диметикона и 400 мл воды. Получение ниосом и инкапсулирование в них AMPs (HNP-1 или hBD-1) осуществлялось при комнатной температуре и интенсивном механическом перемешивании на шейкере в течение 5-10 минут. Для формирования ниосом более мелких размеров смесь интенсивно перемешивалась с использованием гомогенизатора APV. Для формирования ниосом размерами 80-100 нм ранее полученная дисперсия ниосом с инкапсулированными AMPs помещалась в сосуд с целью ультразвуковой обработки. Временные интервалы ультразвуковой обработки: 15, 30 и 45 минут; частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт. В результате повышается эффективность инкапсулирования дефензинов в ниосомы. Для того, чтобы физико-химические характеристики ниосом были постоянными, было использовано 50 мл гелеобразователя Covacryl MV 60 в жидком виде, который образует трехмерную объемную «сетку» при добавлении 20 мл триэтаноламина. Общий объем геля доводился до 1000 мл очищенной водой. Морфологические характеристики полученных ниосом оценивались с помощью сканирующего электронного микроскопа TESCAN Mira3 XMU (США).

Таким образом, используя описанную методику, были получены два геля: ниосомальный α -дефензин-1 (концентрация 1 мкг/мл) и ниосомальный β -дефензин-1 (концентрация 1 мкг/мл).

Ниосомальный α -дефензин-1 с концентрацией 2 мкг/мл был получен аналогичным образом (при растворении 2 мг HNP-1 по вышеописанной методике). Кроме того, в качестве контроля был приготовлен нативный ниосомальный гель, не содержащий активных веществ.

2.2.7. Экспериментальная модель инфицированной раны

В диссертационном исследовании для моделирования экспериментальной раны были использованы лабораторные крысы линии Wistar (самцы, массой 180-200 г). Эксперименты на животных проводились в виварии Ставропольского государственного медицинского университета в соответствии с принципами Женевской конвенции 1985 года о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларацией 2000 года о гуманном отношении к животным. Протоколы экспериментов были одобрены Этическим комитетом Ставропольского государственного медицинского университета (протокол заседания Этического комитета №52 от 16.12.2015).

До начала исследования животные содержались в течение месяца в идентичных условиях, с достаточным количеством пищи и воды. Для моделирования экспериментальной раны животным предварительно удалялась шерсть на месте предполагаемого нанесения дефекта (1 день эксперимента), для этого использовался крем для депиляции (Veet, Франция). Выбор данного способа удаления шерсти объясняется его атравматичностью, отсутствием необходимости использования бритвы и удобством применения. Через сутки после удаления шерсти (2 день эксперимента) лабораторным крысам при помощи инструмента для панч-биопсии (Medax EPT8000-00, Италия; диаметр – 8 мм) наносилась рана на дорсальной поверхности тела в дистальной части поясничной области, после чего в рану вносилось 1-2 мл бактериальной суспензии клинических штаммов *S. aureus* (MSSA, стандарт мутности 0,5 по МакФарланду), выделенных от пациентов с СДС.

Перед нанесением раневого дефекта животным была проведена инфильтрационная анестезия путем подкожного введения лидокаина («Лидокаин буфус» 2% (20 мг/мл) 2 мл, Обновление ПФК, Россия).

Через сутки после инфицирования (3 день эксперимента) лабораторные крысы были случайным образом разделены на 5 групп:

- 1 группа – контроль, нативный ниосомальный гель без дефензинов;
- 2 группа – мазь «Левомеколь»;
- 3 группа – ниосомальный гель с α -дефензином-1, концентрация 1 мкг/мл;
- 4 группа – ниосомальный гель с α -дефензином-1, концентрация 2 мкг/мл;
- 5 группа – ниосомальный гель β -дефензином-1, концентрация 1 мкг/мл.

В каждой группе было по 10 животных ($n=10$). Антимикробные вещества наносились наружно один раз в сутки на пораженный участок, начиная с 4 дня эксперимента – т.е. со вторых суток после нанесения ран и их инфицирования – до 15 дня эксперимента. Общая продолжительность лечения составила 12 суток.

Для контролирования скорости заживления ран использовалось специализированное программное обеспечение Wound Pro для iOS, позволяющее определять площадь (мм^2) и периметр (мм) поверхностных дефектов. Для проведения измерений по данной методике проводится фотографирование ран на строго контролируемом расстоянии от фотообъектива мобильного устройства (контроль осуществляется программным обеспечением), что позволяет исключить ошибки в масштабировании и расчетах. Площадь и периметр ран измерялись на 4, 9 и 16 день эксперимента.

Для оценки заживления ран было использовано несколько методов:

1. Линейная скорость заживления ран (v , $\text{мм}^2/\text{сут}$) [207]:

$$v = \frac{2 \times (S_0 - S_t)}{t \times (P_0 - P_t)} \quad (2),$$

где P_0 и S_0 – периметр и площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; P_t и S_t – периметр и площадь раневой

поверхности через промежуток времени t . В данном случае, с 4 по 9 день эксперимента $t=5$ суток, а с 9 по 16 день эксперимента – $t=7$ суток;

2. Относительная убыль площади ран (ΔS , %) [5]:

$$\Delta S = \frac{(S_0 - S_t) \times 100}{S_0 \times t} \quad (3),$$

где S_0 – площадь раневой поверхности при предшествующем измерении; S_t – площадь раневой поверхности через промежуток времени t . В данном случае, с 4 по 9 день эксперимента $t=5$ суток, а с 9 по 16 день эксперимента – $t=7$ суток;

3. Процентная скорость заживления ран (w , %) [203]:

$$w (\%) = \frac{S_1 - S_t}{S_1 \times 100} \quad (4),$$

где S_1 – изначальная площадь раны (до начала лечения – на 4 день эксперимента), S_t – площадь раны через промежуток времени t – на 9 и 16 день эксперимента.

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

Вычисление относительной убыли площади ран является широко используемым методом оценки заживления поверхностных дефектов [5], однако при расчете данного показателя не учитывается периметр ран (раны с одинаковой площадью могут иметь разный периметр). Этот недостаток учтен при расчете линейной скорости заживления ран [207]. С другой стороны, в зарубежной литературе общепринятым способом оценки регенерации поверхностных дефектов является величина процентной скорости заживления ран [203]. Данный показатель является и наиболее интуитивно понятным – чем ближе величина процентной регенерации ран к 100%, тем большая часть дефекта считается зажившей.

2.3. Статистическая обработка данных

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

Для определения нормальности распределения использовался тест Шапиро-Уилка – при значениях $p > 0,05$ распределение считалось нормальным. В случае, если сравниваемые совокупности имели нормальное распределение, использовался однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Бонферрони (для сравнения независимых выборок), а при сравнении зависимых выборок использовался парный t-критерий Стьюдента. Если сравниваемые совокупности имели ненормальное распределение, использовался непараметрический критерий Уилкоксона (для зависимых выборок) и критерий Манна-Уитни (для независимых выборок). При всех используемых методах статистической обработки при $p < 0,05$ отличия считались статистически достоверными.

Глава 3. СОСТАВ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АЭРОБНОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ЯЗВЕННО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ОЧАГОВ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

3.1. Состав микроорганизмов, выделенных из язвенно-некротических очагов у пациентов с синдромом диабетической стопы

С целью улучшения эффективности антимикробной терапии и поиска новых способов борьбы с антибиотикорезистентностью были обследованы больные с СДС. У пациентов, поступивших на стационарное лечение в период с 2015 по 2018 год, проводился забор отделяемого из диабетических язв и ран с целью идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к противомикробным средствам.

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

Среди грамположительных штаммов большую часть составили *Staphylococcus aureus* – 254 штамма (49,2%) и *Enterococcus spp.* – 251 штамм (48,7%). *Streptococcus spp.* было выделено лишь 11 штаммов (2,1%) (рисунок 5).

Состав грамотрицательных бактерий при СДС был представлен 312 штаммами, среди которых *Escherichia coli* – 85 штаммов (27,2%), *Pseudomonas aeruginosa* – 78 штаммов (25%), *Proteus spp.* – 63 штамма (20,2%), *Klebsiella aerogenes* – 37 штаммов (11,9%), *Klebsiella pneumoniae* – 23 штамма (7,4%), *Acinetobacter baumannii* – 20 штаммов (6,4%), и прочие энтеробактерии составили 6 штаммов (1,9%) (рисунок 5).

Среди 23 штаммов грибов рода *Candida* было выделено 11 штаммов *Candida albicans* (47,8%), 8 штаммов *Candida krusei* (34,9%) и 4 штамма *Candida tropicalis* (17,3%).

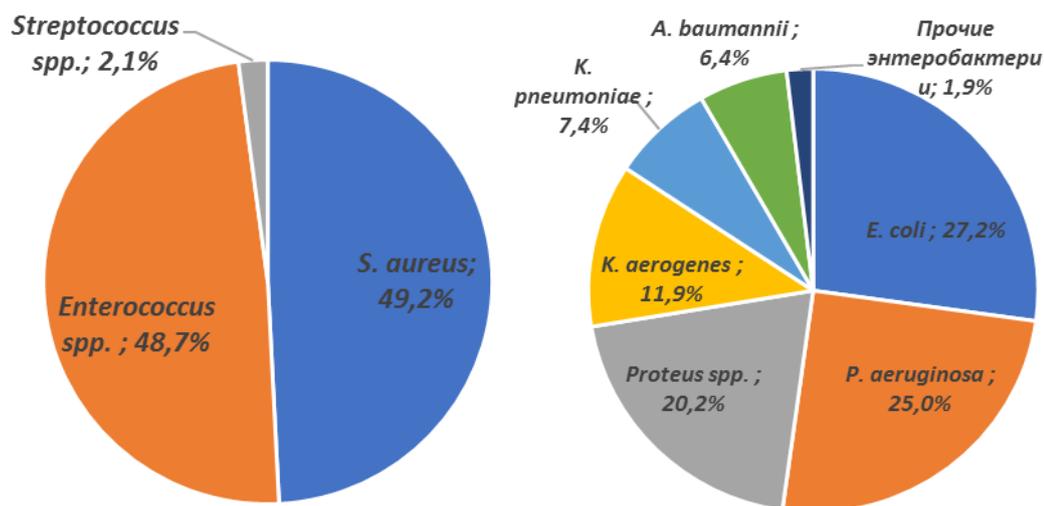


Рисунок 5. Состав грамположительных (слева) и грамотрицательных (справа) микроорганизмов, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Выделение монокультуры (один микроорганизм) наблюдалось у 279 больных. Выделение двух микроорганизмов наблюдалось у 173, а выделение трёх – у 70 пациентов. Кроме того, у четырех больных была выявлена комбинация из четырех микроорганизмов.

Выделение монокультуры наблюдалось в 279 случаях. Чаще всего выделялся *S. aureus* – 103 случая (36,9%). *Enterococcus spp.* были выделены в 53 случаях (18,9%), *Enterobacteriaceae* – в 63 случаях (22,6%), *P. aeruginosa* – в 32 случаях (11,5%). *Candida spp.* были выделены у 6 пациентов (2,1%), *Streptococcus spp.* – у 11 (4%) и *A. baumannii* – у 11 (4%) пациентов.

Выделение двух микроорганизмов наблюдалось у 173 больных. Преобладала ассоциация *E. faecalis* + *Enterobacteriaceae* – у 58 пациентов (33,5%). Ассоциация *S. aureus* + *E. faecalis* встречалась в 40 случаях (23,1%), *S. aureus* + *Enterobacteriaceae* – 31 случай (17,9%), *E. faecalis* + *P. aeruginosa* – 20 случаев (11,6%), *S. aureus* + *P. aeruginosa* – 10 случаев (5,9%), *Enterobacteriaceae* +

Candida spp. – 6 случаев (3,5%), *E. faecalis* + *A. baumannii* – 4 случая (2,3%), *S. aureus* + *A. baumannii* – 2 случая (1,1%), *E. faecalis* + *Candida spp.* – 2 случая (1,1%).

Выделение трёх микроорганизмов наблюдалось у 70 пациентов. Комбинация *S. aureus* + *E. faecalis* + *Enterobacteriaceae* встречалась в 46 случаях (65,7%), *S. aureus* + *E. faecalis* + *P. aeruginosae* – 15 случаев (21,4%), *Candida spp.* + *Enterobacteriaceae* + *E. faecalis* – в 4 случаях (5,7%), *S. aureus* + *E. faecalis* + *A. baumannii* – 3 случая (4,3%), *E. faecalis* + *P. aeruginosae* + *Candida spp.* – 1 случай (1,4%) и *Enterobacteriaceae* + *Enterobacteriaceae* + *E. faecalis* – также 1 случай (1,4%).

У четырех больных наблюдалось выделение комбинации из четырех микроорганизмов: *S. aureus* + *E. faecalis* + *Enterobacteriaceae* + *C. krusei* – 2 случая, а также *S. aureus* + *E. faecalis* + *Enterobacteriaceae* + *C. tropicalis* – 2 случая.

3.2. Антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы

Антибиотикочувствительность грамположительных кокков к АБП была определена у *S. aureus* (n=254), *E. faecalis* (n=251) и *Streptococcus spp.* (n=11) (Таблица 4).

Чувствительность *S. aureus* к оксациллину составила 57,5%, к эритромицину – 56,3%, к гентамицину – 65,8%, к амикацину – 87,8%, к офлоксацину – 66,9% к ципрофлоксацину – 56,3%, к доксициклину – 79,5%, к клиндамицину – 67,7%, к ко-тримоксазолу – 65,7%, и хлорамфениколу – 40,9%. 100% штаммов золотистого стафилококка были чувствительны к ванкомицину, а к рифампицину – 91,7%, нитрофурантоину – 89,8%.

В отношении *E. faecalis* высокой активностью обладал ампициллин – 94,4% чувствительных штаммов. Антибиотикочувствительность к цефоперазону составила 51,4%, имипинему/меропенему – 63,3%, эритромицину – 29,5%, ципрофлоксацину – 66,9%, доксициклину – 51,4%, ко-тримоксазолу – 42,6%, хлорамфениколу – 43,8%. К ванкомицину все штаммы были чувствительны.

Чувствительность к рифампицину и нитрофурантоину составила 81,3% и 96% соответственно.

Streptococcus spp. обладали высокой чувствительностью к исследованным АБП: ампициллин, оксациллин и ванкомицин – 100%; эритромицин и клиндамицин – 81,8%; офлоксацин, хлорамфеникол и доксициклин – 90,9%.

Таблица 4 – Антибиотикочувствительность грамположительных кокков, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы

Препарат	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
Ампициллин	н/о	94,4%	100,0%
Оксациллин	57,5%	н/о	100,0%
Цефоперазон	н/о	51,4%	н/о
Имипенем/меропенем	н/о	63,3%	н/о
Эритромицин	56,3%	29,5%	81,8%
Гентамицин	65,8%	н/о	н/о
Амикацин	87,8%	н/о	н/о
Офлоксацин	66,9%	н/о	90,9%
Ципрофлоксацин	56,3%	66,9%	н/о
Доксициклин	79,5%	51,4%	90,9%
Клиндамицин	67,7%	н/о	81,8%
Ко-тримоксазол	65,7%	42,6%	н/о
Хлорамфеникол	40,9%	43,8%	90,9%
Ванкомицин	100,0%	100,0%	100,0%
Рифампицин	91,7%	81,3%	н/о
Нитрофурантоин	89,8%	96,0%	н/о
н/о – антибиотикочувствительность к данному препарату не была определена			

Антибиотикочувствительность грамотрицательных бактерий была определена у *E. coli* (n=85), *Proteus spp.* (n=63), *K. aerogenes* (n=24), *K. pneumoniae* (n=23), *P. aeruginosa* (n=78), *A. baumannii* (n=20) (Таблица 5).

Чувствительность кишечной палочки к ампициллину составила 25,9%, амоксицилин/клавуланату – 48,2%, цефазолину – 23,5%, цефуроксиму – 29,4%, цефтазидиму – 40%, цефотаксиму – 36,5%, цефоперазону – 47,1%, цефепиму – 40%, имипенему/меропенему – 56,5%, цефоперазон/сульбактаму – 96,5%, гентамицину – 43,5%, амикацину – 75,3%, офлоксацину – 45,9%, ципрофлоксацину – 48,2%,

доксциклину – 48,2%, нитрофурантоину – 37,6%, ко-тримоксазолу – 30,6%, хлорамфениколу – 23,5%.

При определении чувствительности *K. pneumoniae* к АБП были получены следующие результаты: цефтазидим – 13%, цефоперазон – 13%, цефепим – 8,7%, цефоперазон/сульбактам – 91,3%, имипенем/меропенем – 34,5%, гентамицин – 17,4%, амикацин – 56,5%, офлоксацин – 34,9%, цiproфлоксацин – 47,8%, доксициклин – 65,2%.

Результаты антибиотикочувствительности *K. aerogenes* были представлены следующим образом: ампициллин – 8,1%, амоксицилин/клавуланат – 29,7%, цефазолин – 10,8%, цефуроксим – 21,6%, цефоперазон – 45,9%, цефтазидим – 43,2%, цефотаксим – 37,8%, цефепим – 48,6%, цефоперазон/сульбактам – 97,3%, имипенем/меропенем – 54,1%, гентамицин – 62,2%, амикацин – 75,7%, офлоксацин – 51,4%, цiproфлоксацин – 59,5%, доксициклин – 64,9%, нитрофурантоин – 37,8%, ко-тримоксазол – 32,4%, хлорамфеникол – 29,7%.

Чувствительность *Proteus spp.* к ампициллину составила 9,5%, амоксицилин/клавуланату – 31,7%, цефазолину – 6,3%, цефуроксиму – 9,5%, цефтазидиму – 39,7%, цефоперазону – 52,4%, цефотаксиму – 15,9%, цефепиму – 25,4%, цефоперазон/сульбактаму – 95,2%, имипенему/меропенему – 74,6%, гентамицину – 46%, амикацину – 57,1%, офлоксацину – 46%, цiproфлоксацину – 52,4%, нитрофурантоину – 39,7%, ко-тримоксазолу – 38,1%, хлорамфениколу – 20,6%, доксициклину – 85,7%.

Антибиотикочувствительность *P. aeruginosa* была представлена следующим образом: цефтазидим – 43,6%, цефоперазон – 48,7%, цефепим – 50%, цефоперазон/сульбактам – 98,7%, имипенем/меропенем – 62,8%, гентамицин – 48,7%, амикацин – 73%, офлоксацин – 38,5%, цiproфлоксацин – 52,6%.

Результаты чувствительности *A. baumannii* к исследованным антимикробным препаратам были представлены следующим образом: цефтазидим – 15%, цефоперазон – 25%, цефепим – 25%, цефоперазон/сульбактам – 75%,

имипенем/меропенем – 60%, гентамицин – 75%, амикацин – 85%, офлоксацин – 30%, ципрофлоксацин – 40%.

Чувствительность грибов рода *Candida* к противогрибковым препаратам была определена у *C. albicans* (n=11), *C. krusei* (n=8) и *C. tropicalis* (n=4). Результаты чувствительности *C. albicans* были представлены следующим образом: кетоконазол – 100%, клотримазол – 100%, флюконазол – 100%, нистатин – 100%, амфотерицин В – 81,8%. Чувствительность *C. krusei* к клотримазолу составила 100%, нистатину – 87,5%, кетоконазолу – 62,5%, амфотерицину В – 12,5%. *C. tropicalis* обладали 100% чувствительностью к кетоконазолу, клотримазолу и нистатину, а чувствительность к флюконазолу составила 75%, к амфотерицину В – 25%.

Таблица 5 – Антибиотикочувствительность грамотрицательных бактерий, выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы

Препарат	<i>E. coli</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>
Ампициллин	25,9%	9,5%	8,1%	н/о	н/о	н/о
Амоксициллин/клавуланат	48,2%	31,7%	29,7%	н/о	н/о	н/о
Цефазолин	23,5%	6,3%	10,8%	н/о	н/о	н/о
Цефуросим	29,4%	9,5%	21,6%	н/о	н/о	н/о
Цефтазидим	40,0%	39,7%	43,2%	13,0%	43,6%	15,0%
Цефотаксим	36,5%	15,9%	37,8%	н/о	н/о	н/о
Цефоперазон	47,1%	52,4%	45,9%	13,0%	48,7%	25,0%
Цефепим	40,0%	25,4%	48,6%	8,7%	50,0%	25,0%
Цефоперазон/сульбактам	96,5%	95,2%	97,3%	91,3%	98,7%	75,0%
Имипенем/меропенем	56,5%	74,6%	54,1%	34,5%	62,8%	60,0%
Гентамицин	43,5%	46,0%	62,2%	17,4%	48,7%	75,0%
Амикацин	75,3%	57,1%	75,7%	56,5%	73,0%	85,0%
Офлоксацин	45,9%	46,0%	51,4%	34,9%	38,5%	30,0%
Ципрофлоксацин	48,2%	52,4%	59,5%	47,8%	52,6%	40,0%
Доксициклин	48,2%	85,7%	64,9%	65,2%	н/о	н/о
Ко-тримоксазол	30,6%	38,1%	32,4%	н/о	н/о	н/о
Хлорамфеникол	23,5%	20,6%	29,7%	н/о	н/о	н/о
Нитрофурантоин	37,6%	39,7%	37,8%	н/о	н/о	н/о
н/о – антибиотикочувствительность к данному препарату не была определена						

3.3. Заключение

В структуре аэробной микрофлоры, выделенной из язвенно-некротических очагов у госпитализированных пациентов с СДС, преобладает *S. aureus*, причем доля MRSA составляет 42,5%. Кроме того, обращает на себя внимание частое выделение *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa* и *Enterobacteriaceae spp.*, включая *K. pneumoniae* и *K. aerogenes*, а также низкая чувствительность микроорганизмов к карбапенемам и цефалоспорином.

Многим госпитализированным больным с СДС показано применение системной антибиотикотерапии, которая должна назначаться с учетом локальных и региональных данных антибиотикорезистентности микроорганизмов. Лечение поверхностных открытых язв без выраженных признаков воспаления подкожной клетчатки может проводиться с помощью местных антимикробных препаратов и антисептиков [183].

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

При сахарном диабете уровень иммунологической реактивности снижен (за счет ослабления функции лейкоцитов, факторов врожденного иммунитета, ослабления фагоцитоза и бактерицидной активности фагоцитов), что увеличивает восприимчивость к инфекциям [115, 137].

В этой связи можно предположить, что низкая эффективность системной противомикробной терапии при СДС может быть связана не только с высоким уровнем антибиотикорезистентности, но и нарушениями иммунного статуса при сахарном диабете, а также нарушенной микроциркуляцией (что ухудшает проникновение системных антибиотиков в кожу и подкожно-жировую клетчатку). Поэтому представляется интересным попытаться разработать препараты для наружного применения с целью усиления эффективности системной

антибиотикотерапии. С этой позиции большой интерес представляют антимикробные пептиды из класса дефензинов – HNP-1 и hBD-1 [147]. Кроме того, учитывая, что данные пептиды продуцируются организмом для борьбы с инфекциями, важно исследовать их уровень в крови при СДС с целью оценки их роли в данном патологическом процессе.

Глава 4. УРОВЕНЬ ДЕФЕНЗИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

У пациентов с СДС были определены уровни дефензинов HNP-1 и hBD-1 в крови при поступлении в стационар (до начала лечения), а также перед выпиской – после проведенного лечения. Возраст пациентов (n=20) составил $66,8 \pm 9$ лет, вес – $87 \pm 11,7$ кг и рост – $172,8 \pm 8,3$ см.

Результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиль).

У всех обследованных больных (n=20) концентрация HNP-1 крови как при поступлении, так и при выписке из стационара была выше нормальных значений. Уровень α -дефензина-1 в крови у пациентов с СДС до начала лечения составил 15 (11,1; 18,8) нг/мл. Минимальное значение данного антимикробного пептида при поступлении составило 6,5 нг/мл (у пациента с трофической язвой левой стопы), а максимальное значение составило 60,3 нг/мл – пациент с флегмоной правой стопы. После лечения (перед выпиской) уровень HNP-1 снижался ($p=0,0022$) и составил 10,9 (6,5; 12,4) нг/мл, однако не достиг нормальных значений (у здоровых лиц – $3,54 \pm 2,97$ нг/мл [52]). Минимальное значение α -дефензина-1 после проведенного лечения составило 1 нг/мл (флегмона II пальца левой стопы, проведено оперативное лечение: экзартикуляция II пальца левой стопы затем ампутация левой нижней конечности), а максимальное – 65,8 нг/мл (флегмона I пальца левой стопы, проведено оперативное лечение: некрэктомия, ампутация I пальца левой стопы; экзартикуляция I пальца левой стопы).

При определении концентраций β -дефензина-1 в крови у пациентов с СДС (n=20) в целом прослеживались схожие тенденции. До начала лечения средний уровень hBD-1 составлял 42,4 (34,9; 62,8) нг/мл; минимальное значение концентрации данного пептида было 8 нг/мл у двух пациентов: пациента с

трофической язвой левой стопы (тот же пациент с минимальным значением α -дефензина-1 при поступлении) и пациента с гангреной IV пальца правой стопы, флегмоной правой стопы. А максимальный уровень – 92,8 нг/мл (флегмона I пальца левой стопы). После проведенного лечения концентрация β -дефензина-1 в крови достоверно снижалась – 33,4 (20,5; 42,1) нг/мл ($p=0,0035$), причем минимальный уровень составил 2,4 нг/мл (трофическая язва левой стопы), а максимальная концентрация – 70,4 нг/мл (флегмона I пальца левой стопы, проведено оперативное лечение: некрэктомия, ампутация I пальца левой стопы; экзартикуляция I пальца левой стопы). Проведенное лечение не приводило к снижению уровня hBD-1 до нормальных значений (у здоровых лиц верхняя граница нормы – 8,85 нг/мл [98]).

Результаты определения уровней HNP-1 и hBD-1, а также информация по проведенному объему хирургического лечения представлены в таблице 6.

Таким образом, уровень α -дефензинов-1 у пациентов с СДС имеет повышенные значения (по сравнению со значениями у здоровых лиц) как в момент необходимости начала стационарного лечения заболевания, так и после проведенного лечения в стационаре, хотя после лечения концентрация HNP-1 снижается. Вероятно, это связано с увеличением количества нейтрофилов при обострении процесса и инфицировании диабетической язвы. Тот факт, что даже после лечения (хирургического и/или фармакотерапии) уровень HNP-1 не достигает нормальных значений, может объясняться тем, что в целом сахарный диабет (и СДС, в частности) запускает в организме хронический иммуновоспалительный процесс. Постоянно повышенный уровень цитокинов при данном заболевании определяет «хронически» высокий уровень α -дефензина-1 [42].

Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении β -дефензина-1, значения которого достоверно снижались на фоне проводимого лечения, однако так же, как и в ситуации с HNP-1, не достигали значений, определяемых у здоровых лиц.

Следует отметить, что при отдельном сравнении уровней дефенинов у пациентов с развившейся гангреной (n=8) было показано, что уровень HNP-1 также достоверно снижается на фоне лечения (p= 0,0013): у данных пациентов при поступлении уровень α -дефенина-1 был 15,5 (10,3; 18,5) нг/мл, а перед выпиской – 10,2 (9; 12,4) нг/мл. Однако при сравнении концентраций β -дефенина-1 данная тенденция не прослеживалась – уровень hBD-1 не изменялся на фоне проводимого лечения: при поступлении – 38 (29,6; 46,9) нг/мл, после лечения – 38 (27,8; 41,7) нг/мл (p= 0,5095) (в таблице 6 пациенты с гангреной выделены серым фоном).

4.1. Заключение

Полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что HNP-1 и hBD-1 играют важную роль в патогенезе сахарного диабета в целом и СДС, в частности. Тот факт, что данные антимикробные пептиды повышаются в момент необходимости госпитализации (связанной, как правило, с ухудшением состояния больных и, вероятно, обострением патологического процесса), возможно, говорит об их защитной противомикробной функции и участии в процессах заживления ран.

Однако тот факт, что уровень β -дефенина-1 не снижается на фоне лечения у пациентов с гангреной, вызывает вопросы. Предположительно, вероятными причинами этого могут быть: облигатная анаэробная инфекция, выраженная сосудистая недостаточность (вызванная ранним развитием атеросклероза) и гибель мягких тканей.

Основываясь на полученных результатах, представлялось интересным исследовать возможность использования дефенинов HNP-1 и hBD-1 для разработки новых противомикробных препаратов для наружного применения с целью усиления эффективности системной антибиотикотерапии СДС.

Таблица 6 – Уровни HNP-1 и hBD-1 (нг/мл) крови у пациентов с СДС до и после проведенного лечения

№	HNP-1 до лечения	HNP-1 после лечения	hBD-1 до лечения	hBD-1 после лечения	Диагноз: Сахарный диабет 2 типа, синдром диабетической стопы, нейроишемическая форма	Проведенное хирургическое лечение
1	30,2	5,2	63	22,6	Трофическая язва левой стопы. Варикозная болезнь сосудов нижних конечностей.	Некрэктомия.
2	60,32	46,6	61,6	53	Флегмона правой стопы.	Нет.
3	11,4	11	38	22,9	Суставной панариций V пальца правой стопы. Флегмона правой стопы.	Экзартикуляция V пальца средней головки плюсневой кости.
4	15,2	2,3	77,2	15,8	Рана пяточной области критическая ишемия.	Нет.
5	11,3	1,04	22,3	15	Флегмона II пальца левой стопы.	Экзартикуляция II пальца левой стопы. Через 3 суток: ампутация левой нижней конечности.
6	6,48	2	8	2,4	Трофическая язва левой стопы	Нет.
7	19,1	14,4	41,2	41,4	Гангрена II пальца правой стопы (сухая). Трофические язвы правой голени.	Нет.
8	15,7	11,7	62,2	29,6	Флегмона культи левой стопы.	Вскрытие флегмоны, некрэктомия.
9	12,4	13	53,8	41,8	Инфицированная трофическая язва правой стопы.	Иссечение трофической язвы правой стопы.
10	12,5	11,7	43,6	17,2	Флегмона левой стопы.	Вскрытие флегмоны левой стопы.
11	17,9	12,2	28	27	Гангрена III пальца правой стопы. Флегмона правой стопы.	Экзартикуляция III пальца правой стопы и вскрытие флегмоны. Через 4 суток: резекция стопы.
12	11	8,8	8	19,8	Гангрена IV пальца правой стопы. Флегмона правой стопы	Экзартикуляция IV пальца правой стопы.
13	16,2	12,4	34,4	40	Гангрена I пальца правой стопы. Флегмона правой стопы.	Экзартикуляция I пальца правой стопы.
14	14,8	9,4	36,4	36,6	Гангрена III-IV пальцев правой стопы.	Экзартикуляция III-IV пальцев правой стопы. Через 6 суток: экзартикуляция V пальца правой стопы.
15	18,9	11,7	70	60	Инфицированная рана I пальца левой стопы. Флегмона левой стопы.	Некрэктомия. Через 7 суток: ампутация I пальца левой стопы и экзартикуляция I пальца левой стопы.
16	32,9	65,8	92,8	70,4	Флегмона I пальца левой стопы.	Некрэктомия; ампутация I пальца левой стопы; экзартикуляция I пальца левой стопы.
17	10,1	9,6	48,8	41,8	Гангрена V пальца правой стопы.	Экзартикуляция V пальца правой стопы.
18	18,7	10,8	76	57	Гангрена II пальца правой стопы. Флегмона правой стопы	Экзартикуляция II пальца правой стопы.
19	9,4	6,1	39,6	30,2	Гангрена культи.	Резекция стопы.
20	8,8	7,6	39,2	42,2	Флегмона правой стопы.	Вскрытие флегмоны. Через 3 суток: вскрытие флегмоны.

Примечание: серым цветом выделены пациенты с гангреней.

Глава 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИСТАФИЛОКОККОВОЙ АКТИВНОСТИ ДЕФЕНЗИНОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

В экспериментальной части работы в качестве основного инфекционного агента использовались штаммы золотистого стафилококка (MSSA и MRSA), выделенные у пациентов с СДС, т. к. данный микроорганизм занимает лидирующие позиции при бактериологическом исследовании отделяемого из гнойно-некротического очага и представляет наибольшую актуальность с позиции нарастающей антибиотикорезистентности (42,5% составляют метициллин-резистентные штаммы). Кроме того, результаты измерения уровней антимикробных пептидов крови у больных с данной патологией позволили предположить, что α - и β -дефензины могут рассматриваться в качестве перспективных соединений для разработки новых подходов фармакотерапии инфекций, устойчивых к современным противомикробным препаратам, а также, что немаловажно, рассмотреть дефензины как перспективные ранозаживляющие средства.

5.1. Моделирование взаимодействия антимикробного пептида HNP-1 и компонента клеточной стенки бактерий – пептидогликана

На сегодняшний день механизм противомикробного действия дефензинов не до конца изучен – помимо пермеабиллизации (прямого повреждения бактериальной клеточной стенки), вероятно, существуют и другие мишени действия антимикробных пептидов в микробных клетках. Одной из таких мишеней является пептидогликан.

С целью прогнозирования и анализа взаимодействия между молекулами пептидогликана (основного компонента клеточной стенки) и HNP-1 методами компьютерной химии были изучены основные квантово-химические

характеристики, и проведен молекулярный докинг, позволяющий определить ориентацию между молекулами и образование устойчивого комплексного соединения. Особенностью клеточной стенки *S. aureus*, как и всех грамположительных бактерий, является то, что она представлена 5-6 рядами пептидогликана, который составляет до 90% сухой массы клеточной стенки. Молекулярные свойства пептидогликана и HNP-1 сведены в таблице 7.

Таблица 7 – Молекулярные свойства пептидогликана и HNP-1

Показатели	Пептидогликан	HNP-1 (α -дефензин-1)
Потенциальная энергия, ккал/моль	-7838,5	-2873,2
Дипольный момент, Дебай	212,3	44,5
Среднеквадратичный градиент, ккал/($\text{Å} \times \text{моль}$)	0,088	0,10

Полученные данные подтверждают корректность процедуры геометрической оптимизации молекулярных моделей. Величины потенциальной энергии для пептидогликана и HNP-1 являются малыми (-7838,5 и -2873,2 ккал/моль), что свидетельствует об устойчивом состоянии обеих молекул. Среднеквадратичный градиент приближен к нулевому значению (0,088 и 0,10 ккал/($\text{Å} \times \text{моль}$), что подтверждает эффективность минимизации потенциальной энергии и сбалансированность энергетических характеристик системы. Дипольные моменты характеризуют неравномерность распределения заряда на поверхности молекул (212,3 – для пептидогликана и 44,5 Дебая – для HNP-1).

Эффективность разрушения клеточной стенки *S. aureus* можно проанализировать, используя метод молекулярного докинга, который позволяет определить ориентацию между молекулами для образования устойчивого комплексного соединения. Комплексы пептидогликана (рецептора) и HNP-1 (лиганда) являются фактором передачи химического сигнала между двумя молекулами (ингибирующий или каталитический). Результаты молекулярного докинга между пептидогликаном и HNP-1 представлены на рисунке 6 (A-D), они

свидетельствует, что обе молекулы имеют гидрофобные зоны (рисунок 6 (А, В)). Образование комплекса (рисунок 6 (С)) происходит через одну из таких зон (рисунок 6 (D)). На рисунке 6 (С) видно, что молекула α -дефензина-1 проникает внутрь фрагмента пептидогликана. Для оценки пространственного расположения комплексного соединения была проанализирована структурная модель, образовавшаяся во время докинга (рисунок 6 (E-F)).

Модель комплексного соединения свидетельствует, что HNP-1 глубоко проникает в структуру фрагмента молекулы пептидогликана. Это свидетельствует о том, что на этапе докирования происходит снижение потенциальной энергии межмолекулярного соединения. Однако для окончательной оценки действия HNP-1 на клеточные стенки *S. aureus* необходимо изучить молекулярные характеристики соединения, образовавшегося после докирования, таблица 8.

Таблица 8 – Молекулярные свойства комплексного соединения

Показатели	Результаты исследований
Потенциальная энергия (Епот.), ккал/моль	549,3
Дипольный момент, Дебай	67,6
Среднеквадратичный градиент, ккал/(Å ² ×моль)	0,093

Изучение молекулярных свойств докируемых молекул показало, что сумма Епот. двух молекул будет равна -10711,7 ккал/моль (-7838,5 + (-2873,2)). Для образования устойчивого комплекса Епот. соединения должна быть ниже суммы энергий двух исходных компонентов. В данном случае потенциальная энергия комплекса равна достаточно высокому значению 549,3 ккал/моль. Это означает, что соединение является нестойким, и взаимодействие HNP-1 и пептидогликана может приводить к нарушению целостности клеточных стенок либо к серьезным изменениям функциональных свойств исследуемого микроорганизма, что, вероятно, будет проявляться в виде продольно-поперечных линейных разрушений вдоль всего диаметра бактериальной клетки.

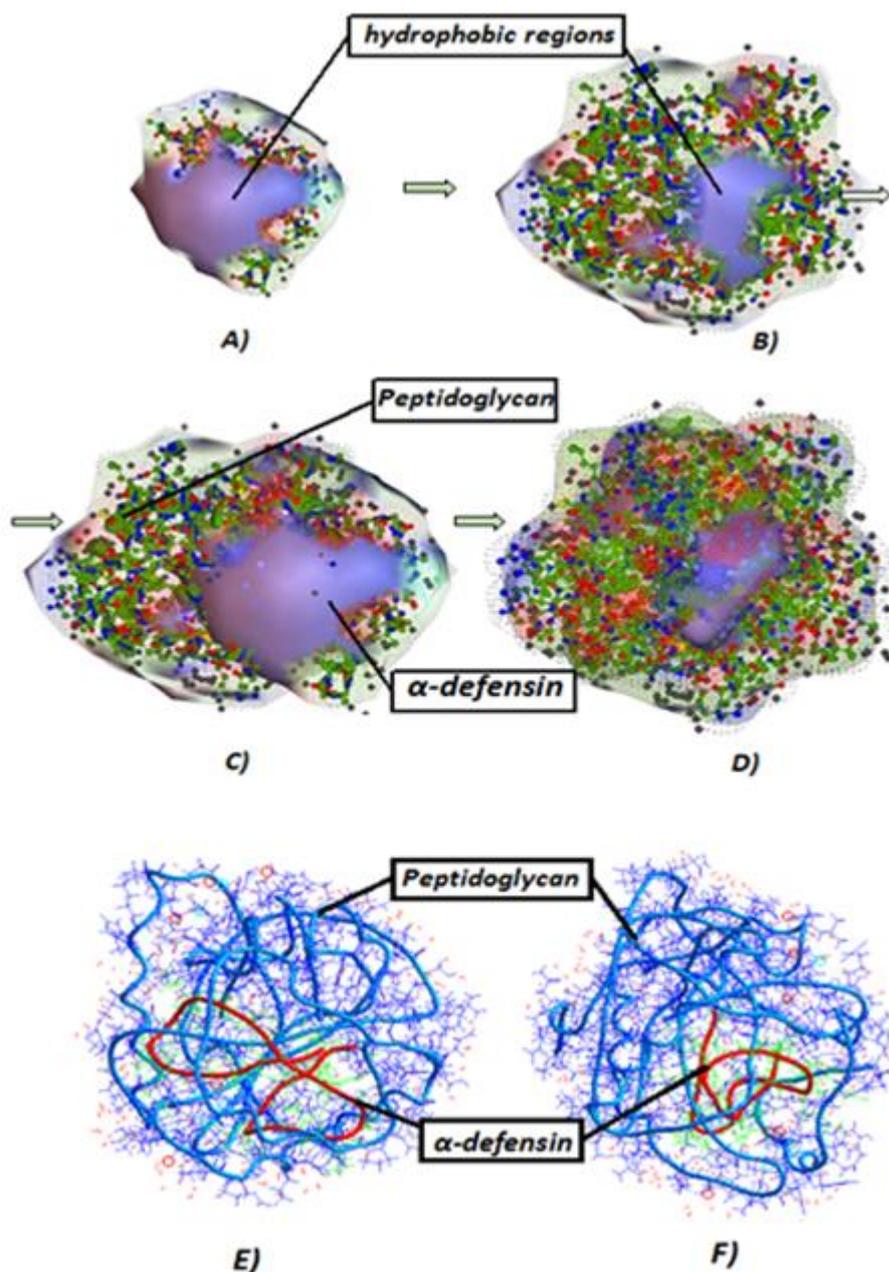


Рисунок 6. Этапы молекулярного докинга; А) молекула α -дефензина-1 (HNP-1); В) фрагмент молекулы пептидогликана; С) промежуточный этап докирования; D) комплексное соединение; E) структурная модель комплекса фрагмента пептидогликана с HNP-1 (фронтальная проекция); F) – она же, проекция сбоку.

Таким образом, компьютерное моделирование позволило получить данные о взаимодействии дефензинов и пептидогликана, которое может приводить к гибели микробных клеток путем разрушения клеточной стенки. Для подтверждения и визуализации полученных данных была использована высокоразрешающая атомно-силовая микроскопия.

5.2. Сравнительная характеристика влияния цефотаксима и HNP-1 на морфологические характеристики клеток *S. aureus* по данным атомно-силовой микроскопии

*5.2.1. Влияние цефотаксима на *S. aureus**

Изображения, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, позволили получить представление о влиянии бета-лактаминового АБП цефотаксима на морфометрические свойства золотистого стафилококка. Было показано, что *S. aureus* адсорбируется, как правило, в виде групп клеток, а также в виде небольших агрегатов либо формирует классические, «гроздевидные», агрегаты на поверхности слюдяной подложки (Рисунок 7).

При сканировании контрольных образцов (*S. aureus*, не подвергнутые действию цефотаксима) бактерии, по данным атомно-силовой микроскопии, определялись как кокковидные объекты сферической формы со следующими параметрами (для *S. aureus* через 5 и 20 минут инкубации при 37 °С, соответственно): диаметр – 1,13 мкм и 1,02 мкм, высота – 0,61 мкм и 0,59 мкм, площадь – 1,09 мкм² и 0,95 мкм².

При сканировании опытных образцов – *S. aureus*, подвергнутые действию цефотаксима (32 мкг/мл) в течение 5 и 20 минут, микроорганизмы определялись как объекты сферической формы с наличием морфологически аномальных изменений на поверхности (Рисунок 8). Более того, они имели меньший диаметр и площадь по сравнению с бактериями, не подвергнутыми действию антибиотика. Также следует отметить, что воздействие АБП приводило к уменьшению количества бактериальных клеток в поле сканирования. Размерные характеристики *S. aureus*, подвергнутых влиянию цефотаксима (5 и 20 минут инкубации при 37 °С соответственно): диаметр – 0,98 мкм и 0,87 мкм, площадь – 0,86 мкм² и 0,78 мкм², высота – 0,68 мкм и 0,62 мкм. Основные морфологические параметры приведены в таблице 9.

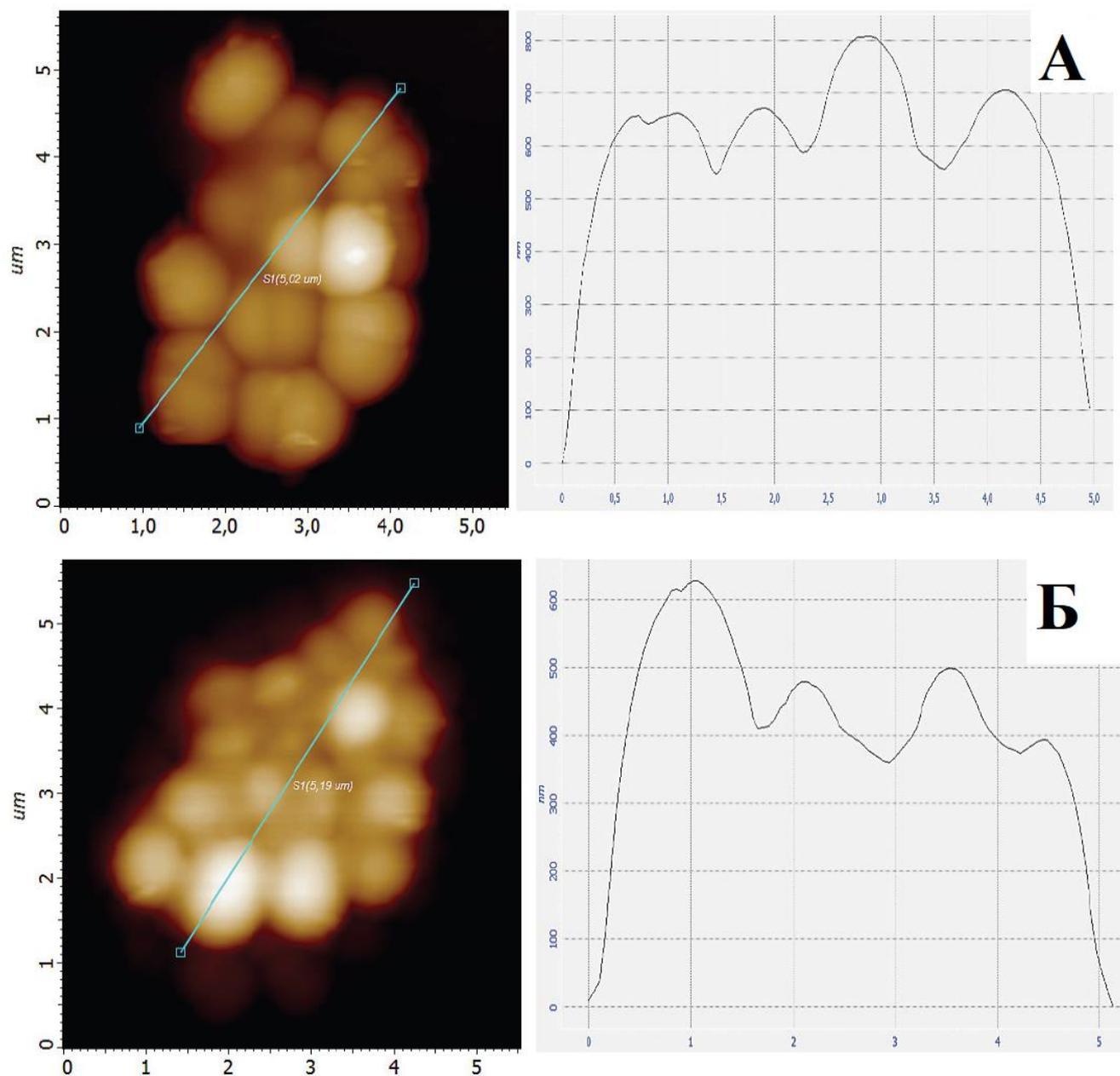


Рисунок 7. Результаты сканирования контрольных образцов (*S. aureus*, не подвергнутые влиянию цефотаксима): А – через 5 минут инкубации при 37 °С, Б – через 20 минут инкубации при 37 °С.

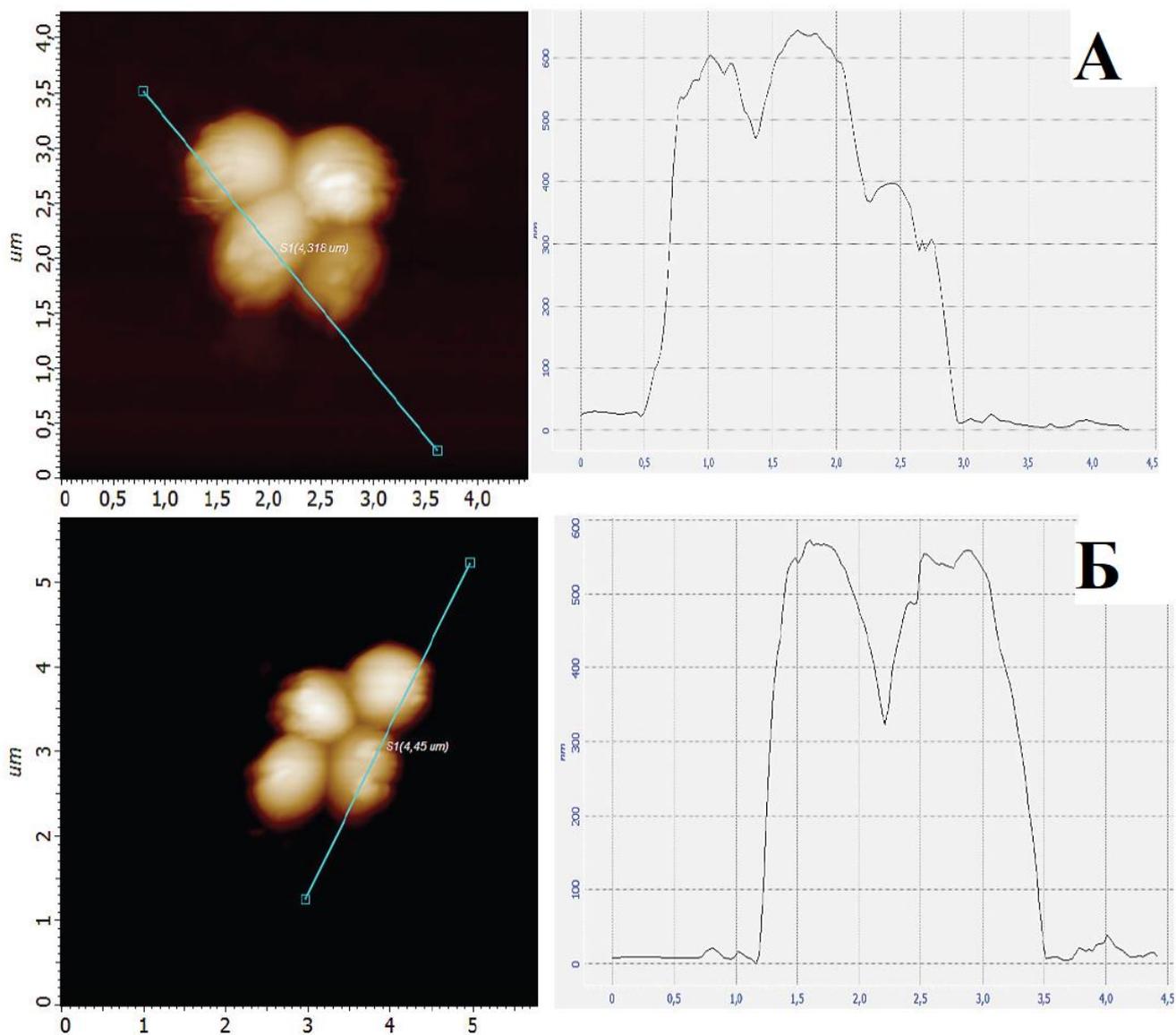


Рисунок 8. Результаты сканирования опытных образцов (*S. aureus*, подвергнутые действию цефотаксима, 32 мкг/мл): А – через 5 минут инкубации с антибиотиком при 37 °С, Б – через 20 минут инкубации с антибиотиком при 37 °С.

Таблица 9 – Основные размерные характеристики *S. aureus* по данным атомно-силовой микроскопии

Исследуемые образцы	Морфологические характеристики					
	Диаметр (мкм)		Высота (мкм)		Площадь (мкм ²)	
	Me (25 %; 75 %)	SD	Me (25 %; 75 %)	SD	Me (25 %; 75 %)	SD
Контроль-1 (<i>S. aureus</i> без цефотаксима; 5 мин инкубации при 37 °С)	1,13 (1,07; 1,17) (n=78)	0,08	0,61 (1,58; 0,66) (n=65)	0,05	1,09 (1,06; 1,13) (n=72)	0,06
Опыт-1 (<i>S. aureus</i> + цефотаксим 32 мкг/мл; 5 мин инкубации при 37 °С)	0,98 (0,93; 1,02) (n=64)	0,06	0,68 (0,66; 0,71) (n=65)	0,04	0,86 (0,82; 0,89) (n=74)	0,05
P (контроль-1 и опыт-1)	<0,001*		<0,001*		<0,001*	
Контроль-2 (<i>S. aureus</i> без цефотаксима; 20 мин инкубации при 37 °С)	1,02 (0,98; 1,08) (n=69)	0,06	0,59 (0,57; 0,61) (n=71)	0,03	0,95 (0,91; 0,99) (n=68)	0,04
Опыт-2 (<i>S. aureus</i> + цефотаксим мкг/мл; 20 мин инкубации при 37 °С)	0,87 (0,82; 0,92) (n=71)	0,06	0,62 (0,59; 0,68) (n=71)	0,05	0,78 (0,69; 0,87) (n=78)	0,09
p (контроль-2 и опыт-2)	<0,001*		<0,001*		<0,001*	

Примечание: (Me – медиана; интерквартильный размах (25 %; 75 %); SD – стандартное отклонение; n – количество измерений; * – отличия при $p < 0,05$).

При проведении атомно-силовой микроскопии, помимо основных морфометрических параметров *S. aureus*, была определена и среднеквадратичная «шероховатость» (бугристость) (сокр. RMS, от англ. root mean square) поверхности бактериальных клеток [152]. Расчёт RMS основан на среднеквадратичной величине отклонений размеров пиков и впадин от средней линии поверхности подложки. Что касается шероховатости профиля, то она измеряется последовательно по нескольким базовым длинам, представляющим в совокупности общую длину пути по поверхности. RMS была рассчитана автоматически во время проведения АСМ с

помощью программного обеспечения NovaPх 3.4, использующего математические методы обработки полученных данных.

Для того, чтобы вычислить уровень среднеквадратичной шероховатости, в каждом образце по нескольким отсканированным участкам было отобрано от 60 до 80 клеток золотистого стафилококка, по которым проводилось измерение. Следует отметить, что примерная область выборки участка поверхности каждой бактериальной клетки выдерживалась в пределах $\sim 152 \text{ нм}^2$.

Уровень среднеквадратичной шероховатости в контрольных образцах составил 16,716 нм (время инкубации 5 минут при 37 °С) и 17,844 нм (время инкубации 20 минут при 37 °С) (Рисунок 9). Уровень RMS в опытных образцах составил 30,803 нм и 39,401 нм (соответственно для 5 и 20 минут инкубации с цефотаксимом при 37 °С). Существенные отличия в величинах RMS между контрольными и опытными образцами, вероятно, объясняются действием цефотаксима, который подавляет синтез пептидогликана, что приводит к последующим изменениям бугристости клеточной стенки. Более того, выраженная «шероховатость» опытных образцов сопровождалась расположением гранулярных структур вокруг наружной поверхности бактерий. Вероятно, данные гранулярные структуры являются фрагментами пептидогликана, «выброшенными» во внешнюю среду при нарушении целостности клеточной стенки.

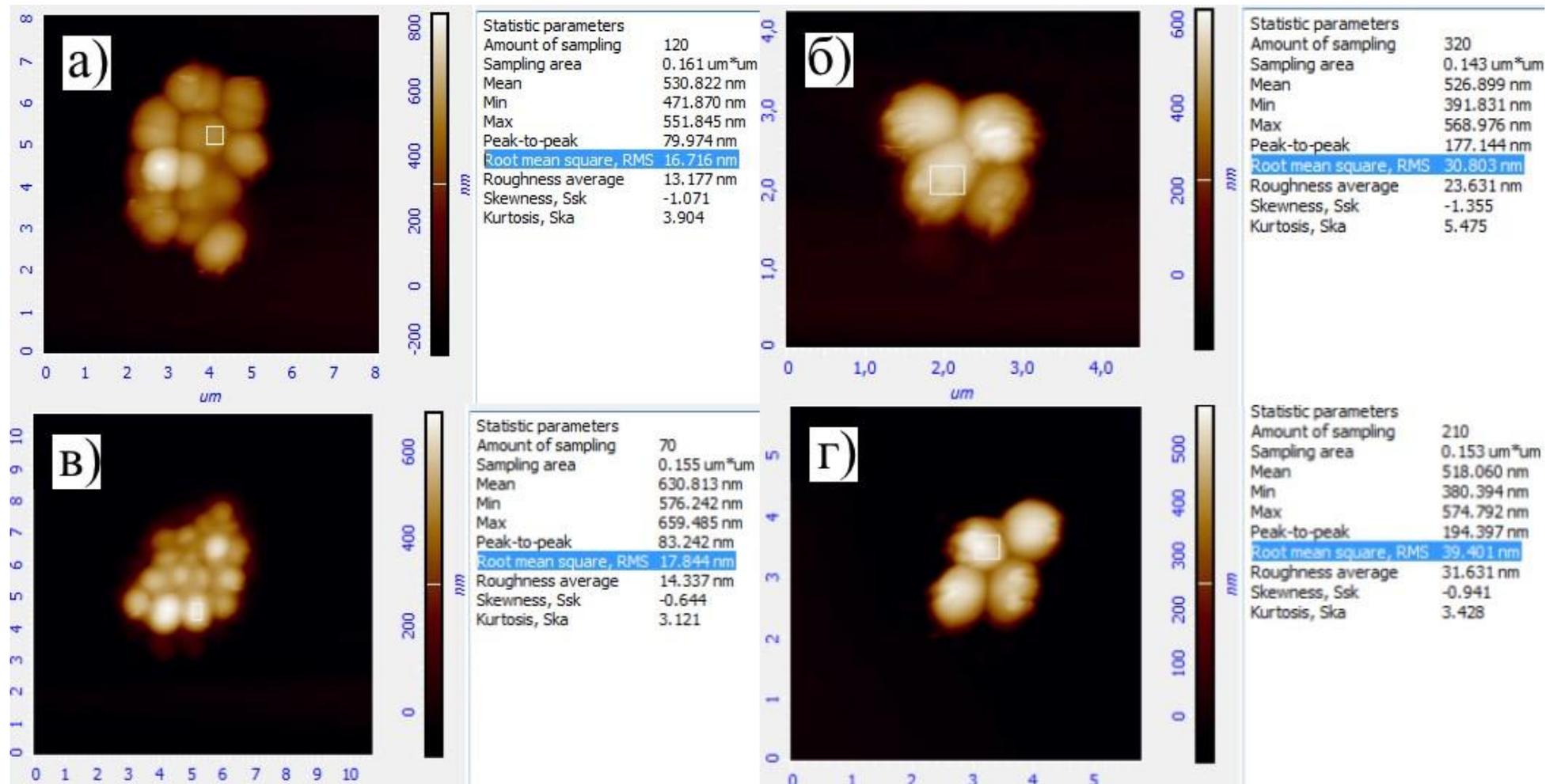


Рисунок 9. Среднеквадратичная «шероховатость» *S.aureus* (RMS): а) контроль-1, инкубация 5 мин при 37 °C без цефотаксима; б) опыт-1, инкубация бактерий с цефотаксимом (32 $\mu\text{г}/\text{мл}$) в течение 5 мин при 37 °C; в) контроль-2, инкубация 20 мин при 37 °C без цефотаксима; г) опыт-2, инкубация бактерий с цефотаксимом (32 $\mu\text{г}/\text{мл}$) в течение 20 мин при 37 °C.

5.2.2. Влияние α -дефензина-1 на *S. aureus*

Морфология *S. aureus*, не подвергнутых действию HNP-1 (контроль-1, время инкубации 5 минут при 37 °С) представлена на рисунке 10 (а). Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии данные свидетельствуют, что клетки золотистого стафилококка определяются, как кокковидные объекты сферической формы, напоминающие «гроздь винограда» на поверхности подложки (аналогично с результатами предыдущего эксперимента – раздел 3.3, рисунок 7).

Атомно-силовая микроскопия бактерий, инкубированных с HNP-1 в течение 5 минут при 37 °С (опыт-1, концентрации HNP-1 – 2,5 и 5 мкг/мл), показала, что бактериальные клетки определялись как объекты сферической формы с наличием морфологически выраженных повреждений на поверхности (рисунок 10 (б и в) .

Изображения, полученные при проведении атомно-силовой микроскопии *S. aureus*, инкубированных в течение 20 минут при 37 °С без HNP-1 (контроль-2), представлены на рисунке 11 (а) – бактериальные клетки определялись как объекты правильной сферической формы без видимых нарушений клеточной стенки.

При инкубации золотистого стафилококка с α -дефензином-1 в течение 20 минут при 37 °С (опыт-2, концентрации HNP-1 – 2,5 и 5 мкг/мл) было показано, что повреждения клеточной стенки имеют более выраженный характер, чем при инкубации с HNP-1, в течение 5 минут и в поле сканирования почти не определялось целых клеток (рисунок 11 (б и в).

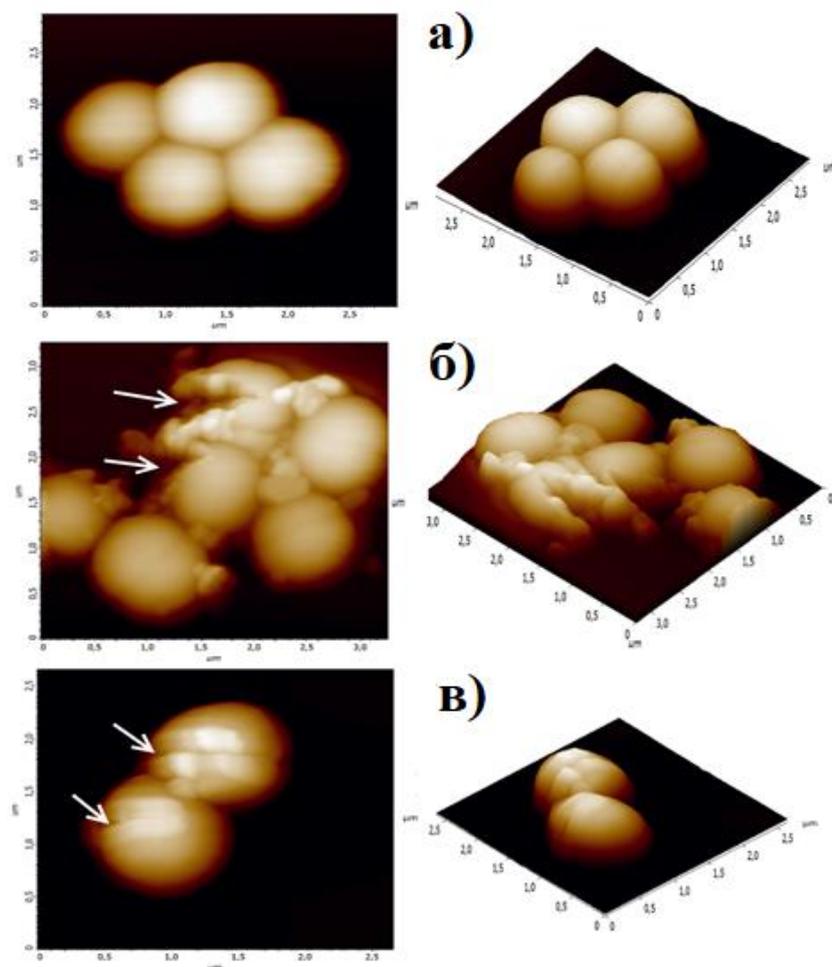


Рисунок 10. АСМ изображение *S. aureus*: а) без воздействия ННР-1 (контроль-1); б) пример бактериального повреждения после воздействия ННР-1 (2,5 мкг/мл); в) после воздействия ННР-1 (5 мкг/мл). Для всех образцов время инкубации составило 5 мин при 37 °С. Стрелками указаны участки наиболее выраженных повреждений.

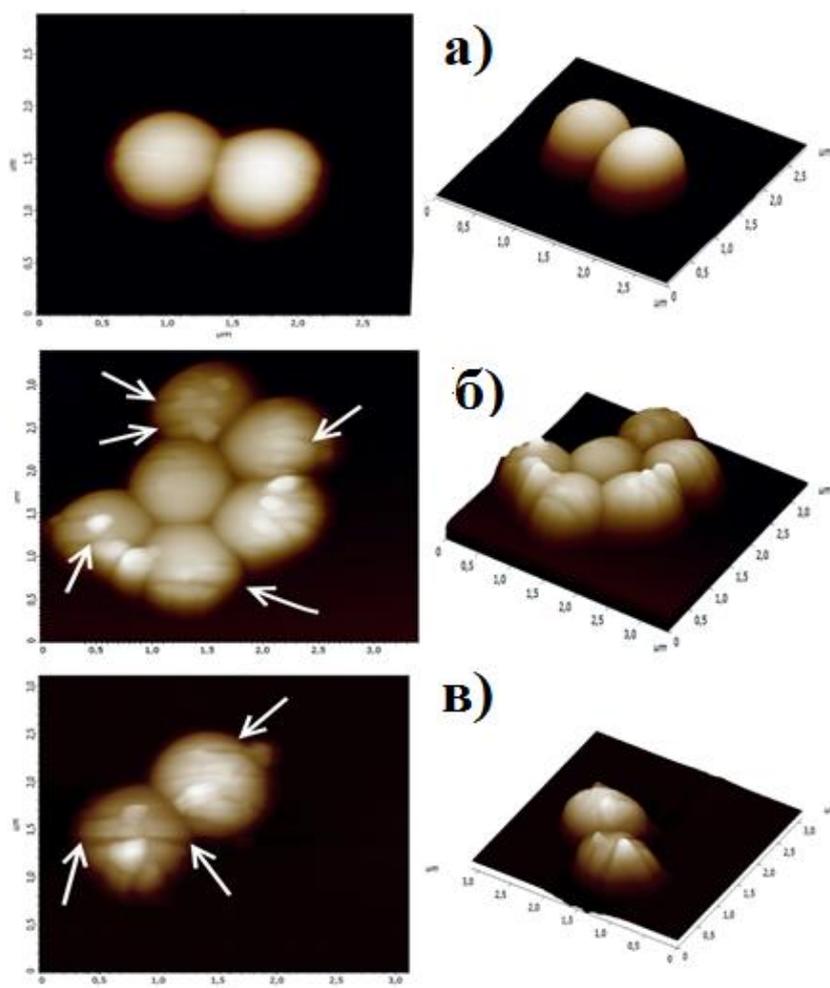


Рисунок 11. АСМ изображение *S. aureus*: а) без воздействия ННР-1 (контроль-2); б) пример бактериального повреждения после воздействия ННР-1 (2,5 мкг/мл); в) после воздействия ННР-1 (5 мкг/мл). Для всех образцов время инкубации составило 20 мин при 37 °С. Стрелками указаны участки наиболее выраженных повреждений.

Таким образом, было показано, что цефотаксим и дефензины оказывают разное действие на клетки золотистого стафилококка по данным АСМ: бета-лактамный антибиотик вызывает образование взбуханий на наружной поверхности клеточной стенки, что свидетельствует о несостоятельности бактериальной стенки и, вероятно, вызвано ингибированием синтеза пептидогликана. Антимикробный пептид создает линейные продольно-поперечные разрывы вдоль всего диаметра бактериальных клеток, что, по всей видимости, объясняется механизмом пермеабилзации мембраны [147].

5.3. Оценка антистафилококковой активности HNP-1 и hBD-1 методом серийных разведений

Результаты проведенных исследований позволяют с уверенностью сказать, что дефензины обладают противомикробной активностью против золотистого стафилококка, и проведение компьютерного моделирования и атомно-силовой микроскопии позволило получить данные о возможном механизме действия антимикробных пептидов. Однако с целью разработки лекарственных препаратов, представлялось необходимым сначала исследовать антимикробный эффект дефензинов с помощью стандартного метода серийных разведений.

Минимальная подавляющая концентрация (МПК) HNP-1 в отношении MSSA и MRSA составила 1 мкг/мл. МПК β -дефензина-1 в отношении MSSA и MRSA также была идентична и составила 0,5 мкг/мл. Кроме того, методом серийных разведений была определена МПК цефотаксима в отношении MSSA – 2 мкг/мл. МПК данного антибиотика в отношении MRSA не была определена, так как метициллин-резистентные штаммы не чувствительны к бета-лактамным антимикробным препаратам (исключение составляют цефалоспорины V поколения).

Первая исследуемая комбинация была HNP-1 (диапазон концентраций от 0 до 5 мкг/мл) + цефотаксим (от 0 до 32 мкг/мл) – было показано, что сочетание данных антимикробных агентов позволяет снизить их «комбинированную» МПК – комбинация HNP-1 (0,5 мкг/мл) + цефотаксим (1 мкг/мл) приводила к подавлению роста MSSA – таблица 10.

Сочетанное использование hBD-1 и цефотаксима в отношении MSSA также приводило к усилению противомикробной активности данных агентов – 0,25 мкг/мл hBD-1 + 1 мкг/мл цефотаксима подавляли рост бактерий – таблица 12.

При воздействии комбинации двух дефензинов также удалось добиться взаимного усиления их антимикробного эффекта в отношении MSSA – рост

отсутствовал при использовании комбинации 0,5 мкг/мл HNP-1 + 0,25 мкг/мл hBD-1 – таблица 14.

Индексы фракционной подавляющей концентрации (иФПК) приведены в таблице 16. Расчет иФПК показал, что совместное использование α -дефензина-1 и цефотаксима в отношении MSSA приводит к аддитивному складыванию антимикробного эффекта данных веществ. Такая же закономерность была выявлена при сочетанном применении против MSSA β -дефензина-1 и цефотаксима, а также при комбинации HNP-1 и hBD-1.

иФПК в отношении MRSA при сочетанном применении α -дефензина-1 и β -дефензина-1 составил 1,5 (Таблицы 15 и 16), что свидетельствует о том, что данные дефензины никак не влияют на противомикробную активность друг друга.

Рассчитать иФПК для комбинаций HNP-1 + цефотаксим (Таблица 11) и hBD-1 + цефотаксим (Таблица 13) в отношении MRSA невозможно, так как МПК цефотаксима в отношении данного штамма стафилококка невозможно определить ввиду резистентности.

Таблица 10 – Влияние различных концентраций комбинаций цефотаксима и HNP-1 на рост *S. aureus* (MSSA)

	MSSA										
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3	
HNP-1 (мкг/мл)	5										
	2.5										
	1										
	0.5										
	0.25										
	0.125										
	0										
		0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Цефотаксим (мкг/мл)											

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 11 – Влияние различных концентраций комбинаций цефотаксима и HNP-1 на рост *S. aureus* (MRSA)

	MRSA										
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3	
HNP-1 (мкг/мл)	5										
	2.5										
	1										
	0.5										
	0.25										
	0.125										
	0										
		0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Цефотаксим (мкг/мл)											

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 12 – Влияние различных концентраций комбинаций цефотаксима и hBD-1 на рост *S. aureus* (MSSA)

	MSSA										
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3	
hBD-1 (мкг/мл)	5										
	2.5										
	1										
	0.5										
	0.25										
	0.125										
	0										
		0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Цефотаксим (мкг/мл)											

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 13 – Влияние различных концентраций комбинаций цефотаксима и hBD-1 на рост *S. aureus* (MRSA)

	MRSA										
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3	
hBD-1 (мкг/мл)	5										
	2.5										
	1										
	0.5										
	0.25										
	0.125										
	0										
		0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
Цефотаксим (мкг/мл)											

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 14 – Влияние различных концентраций комбинаций HNP-1 и hBD-1 на рост *S. aureus* (MSSA)

	MSSA									
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3
HNP-1 (мкг/мл)	5									
	2.5									
	1									
	0.5									
	0.25									
	0.125									
	0									
		0	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5		
	hBD-1 (мкг/мл)									

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 15 – Влияние различных концентраций комбинаций HNP-1 и hBD-1 на рост *S. aureus* (MRSA)

	MRSA									
		К-1	К-1	К-1	К-2	К-2	К-2	К-3	К-3	К-3
HNP-1 (мкг/мл)	5									
	2.5									
	1									
	0.5									
	0.25									
	0.125									
	0									
		0	0.125	0.25	0.5	1	2.5	5		
	hBD-1 (мкг/мл)									

Примечание: К-1 – контроль-1, К-2 – контроль-2, К-3 – контроль-3 (см. материалы и методы). Серым цветом закрашены лунки, в которых был зафиксирован рост микроорганизмов, белым – отсутствие роста.

Таблица 16 – Индексы фракционной подавляющей концентрации (иФПК) исследованных комбинаций противомикробных агентов

Микроорганизм	Вещество А	иФПК	
		Вещество Б	
		Цефотаксим	HNP-1
MSSA	HNP-1	1	-
	hBD-1	1	1
MRSA	HNP-1	не определена	-
	hBD-1	не определена	1,5

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

5.4. Влияние ниосомальных дефензинов на скорость заживления инфицированных ран в эксперименте

На основании полученных данных при определении концентраций HNP-1 и hBD-1 в крови у больных с СДС представлялось интересным изучить противомикробную и ранозаживляющую активность в экспериментальной модели, инфицированной золотистым стафилококком раны. Выбор простейшей *S. aureus*-инфицированной раны обосновывается, во-первых, тем, что по результатам определения структуры микрофлоры данный микроорганизм занимает ведущее место у пациентов с СДС. Во-вторых, при использовании данной модели результаты эксперимента могут быть экстраполированы не только на СДС, но и на инфицированные раны (хирургические и не хирургические), ожоги, трофические язвы и другие процессы, где требуется, с одной стороны, уничтожение инфекционного агента, а с другой, – активация процесса регенерации и ангиогенеза.

Дефензины были инкапсулированы в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы) – по данным электронной микроскопии, размер полученных наночастиц составил $91,3 \pm 21,8$ нм (Рисунок 12).

Были получены лекарственные формы на основе HNP-1 и hBD-1 в виде ниосомальных гелей для наружного применения, эффективность которых была исследована в экспериментальной модели инфицированной золотистым стафилококком раны в сравнении с контрольной группой (нативный ниосомальный гель без дефензинов) и мазью «Левомеколь».

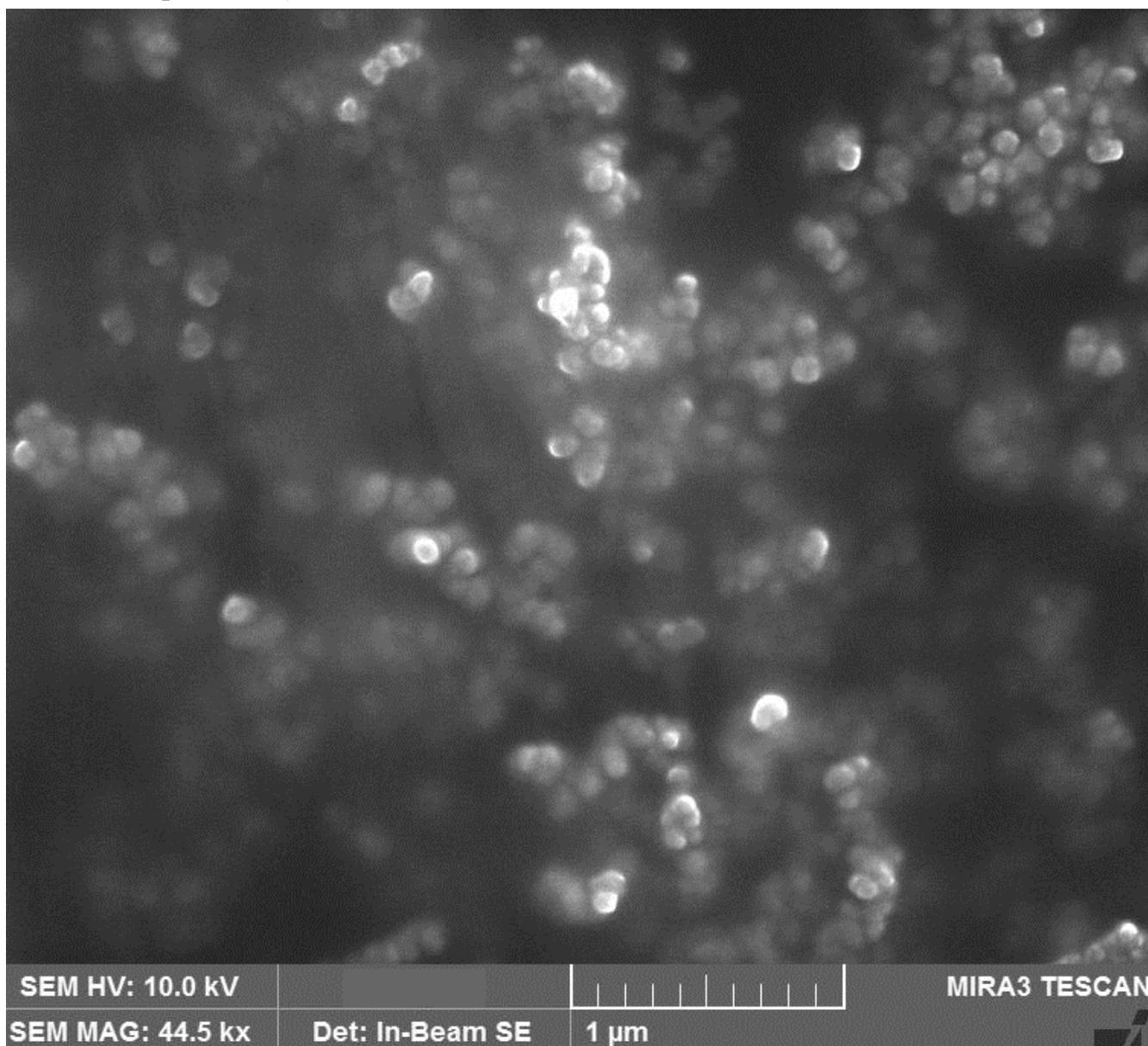


Рисунок 12. Электронная микрофотография полученных наночастиц (режим обратного рассеивания).

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

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

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

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

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

В таблице 17 представлены результаты измерения площадей и периметров во всех группах в соответствующие дни эксперимента. Очевидно, что во всех группах прослеживалась тенденция к заживлению ран, однако для проведения сравнения между группами в динамике рациональнее использовать относительные величины v , ΔS и w (а не абсолютные – площадь и периметр).

Таблица 17 – Периметры и площади ран на 4, 9 и 16 день эксперимента

К р ы с а	1 группа (контроль)						2 группа («Левомеколь»)						3 группа (HNP-1, 1 мкг/мл)						4 группа (HNP-1, 2 мкг/мл)						5 группа (hBD-1, 1 мкг/мл)										
	4		9		16		4		9		16		4		9		16		4		9		16		4		9		16						
	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S
1	4	22	5	25	2	16	6	28	8	34	2	15	4	24	5	26	5	35	4	25	1	13	0	0	5	27	4	25	1	15					
2	6	30	3	19	3	19	6	28	4	27	2	18	7	30	5	26	3	22	9	40	5	29	4	26	7	31	4	25	0	0					
3	5	27	2	18	3	19	6	29	6	31	2	19	7	37	7	34	7	34	5	29	2	15	0	0	6	27	5	26	0	0					
4	5	26	6	29	5	25	7	30	4	24	3	20	7	33	7	31	5	36	7	38	4	24	2	17	8	33	5	26	4	25					
5	5	28	4	25	2	18	5	30	2	22	1	14	5	27	4	23	5	28	5	27	2	18	0	0	7	32	6	28	2	18					
6	5	25	6	30	5	28	6	29	2	16	0	0	5	28	3	21	2	18	8	36	2	16	0	0	7	30	3	20	2	17					
7	5	25	5	26	3	20	5	25	4	24	3	20	5	27	4	24	2	17	5	27	1	14	0	0	7	31	4	24	1	14					
8	6	28	3	19	3	20	6	30	6	30	0	0	4	23	3	21	3	19	6	31	3	19	0	0	4	24	1	13	0	0					
9	8	35	7	32	6	32	7	32	8	32	1	13	5	25	3	21	2	17	4	24	2	18	0	0	8	32	2	20	2	19					
10	5	27	7	31	8	34	6	29	4	25	1	10	5	27	6	32	5	27	5	29	3	21	0	0	8	38	6	29	1	10					

Примечание: S (мм²) – площадь ран, P (мм) – периметр ран.

5.4.1. Сравнение линейной скорости заживления ран

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

При вычислении линейной скорости заживления ран (v) с 4 по 9 день эксперимента (первые пять дней лечения) в 1 группе были получены следующие результаты: среднее значение v составило $0,0053 \pm 0,0154$ мм²/сут, причем у четырех крыс линейная скорость заживления ран имела отрицательные значения – таблица 18. Расчет v с 9 по 16 день эксперимента показал схожие данные – $0,0049 \pm 0,0087$ мм²/сут – статистически достоверные отличия v внутри группы отсутствовали ($p=0,9516$).

Линейная скорость заживления ран во 2 группе («Левомеколь») с 4 по 9 день эксперимента составила $0,0099 \pm 0,0150$ мм²/сут; с 9 по 16 день эксперимента v достоверно не изменилась ($p=0,1115$) – $0,0253 \pm 0,0175$ мм²/сут (таблица 18).

Крысы из 3 группы (ниосомальный гель с α -дефензином-1, концентрация 1 мкг/мл) в первые 5 дней лечения (с 4 по 9 день эксперимента) продемонстрировали линейную скорость заживления ран равную $0,0058 \pm 0,0091$ мм²/сут. С 9 по 16 день эксперимента данный показатель значимо не изменился и составил $0,0048 \pm 0,0061$ мм²/сут ($p=0,7422$) (таблица 18).

В 4 группе (ниосомальный гель с α -дефензином-1, концентрация 2 мкг/мл) величина v в первые 5 дней лечения составила $0,0272 \pm 0,0094$ мм²/сут. С 9 по 16 день эксперимента линейная скорость заживления ран достоверно не изменилась – $0,0285 \pm 0,0127$ мм²/сут ($p=0,8127$).

Животные, получавшие ниосомальный гель с β -дефензином-1 в концентрации 1 мкг/мл (5 группа), с 4 по 9 день эксперимента имели v равную $0,0208 \pm 0,0131$ мм²/сут; в последующие 7 суток не произошло значимых изменений

линейной скорости заживления ран ($p=0,7117$) – $v=0,0241\pm 0,0176$ мм²/сут (таблица 18).

Таблица 18 – Линейная скорость заживления ран (мм²/сут) с 4 по 9 (v_9) и с 9 по 16 день (v_{16}) эксперимента

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

Результаты однофакторного дисперсионного анализа с коррекцией Бонферрони показали, что ниосомальный HNP-1 в концентрации 1 мкг/мл не имеет значимых отличий от контрольной группы. «Левомеколь» в первые 5 дней лечения также не имел достоверных отличий от контроля. Наибольшую эффективность из всех препаратов (при сравнении величин линейной скорости заживления ран) демонстрирует ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл. Более того, по полученным данным, α -дефензин-1 (2 мкг/мл) в первые 5 дней лечения оказался единственным эффективным средством из всех. В последующие 7 дней лечения (с 9 по 16 день эксперимента) было показано, что ниосомальные дефензины HNP-1 (2 мкг/мл), hBD-1 (1 мкг/мл) и «Левомеколь» одинаково эффективны по сравнению друг с другом и имеют достоверные отличия от контрольной и 3 групп (HNP-1, 1 мкг/мл). Результаты сравнительного статистического анализа представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты сравнения линейной скорости заживления ран с 4 по 9 и с 9 по 16 день эксперимента с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Бонферрони

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

5.4.2. Сравнение относительной убыли площади ран

Величина относительной убыли площади ран (ΔS , %) рассчитывалась по формуле (2) для каждой группы на 9 (ΔS_9 ; 5 дней лечения) и 16 дни (ΔS_{16} ; 12 дней лечения) эксперимента. Так как в некоторых группах ΔS имела ненормальное распределение для сравнения совокупностей использовался критерий Манна-Уитни.

В 1 группе относительная убыль площади ран с 4 по 9 день эксперимента (ΔS_9) составила $1,8 \pm 7,1\%$, при этом максимальное значение данной величины было 12%, а минимальное -8%. В последующие 7 дней эксперимента $\Delta S_{16} = 1,9 \pm 4,6\%$, где

максимальное значение относительной убыли площади ран равнялось 8,6%, а минимальное -7,1%. Достоверных отличий внутри группы между ΔS_9 и ΔS_{16} выявлено не было ($p=1$).

Во 2 группе (животные получали «Левомеколь») величина ΔS_9 составила $4,2 \pm 6,5\%$ – максимальное значение относительной убыли площади ран было 13,3%, а минимальное -6,7%. Достоверных отличий от контрольной группы не было выявлено ($p=0,4057$). С 9 по 16 день эксперимента $\Delta S_{16}=9,3 \pm 3,9\%$, при этом максимальные и минимальные значения ΔS_{16} составили 14,3% и 3,6%, соответственно. В данном случае были выявлены статистически значимые отличия от величины ΔS_{16} контрольной группы ($p=0,0019$), хотя внутри 2 группы между ΔS_9 и ΔS_{16} не было значимых отличий ($p=0,0588$). Эти результаты подтверждают данные, полученные при вычислении линейной скорости заживления ран – «Левомеколь» в первые 5 дней лечения не имеет отличий от контрольной группы, однако в последующие 7 дней данный препарат способствует более быстрому заживлению ран по сравнению с контролем.

В 3 группе (животные получали лечение ниосомальным α -дефензином-1 в концентрации 1 мкг/мл) $\Delta S_9=2,6 \pm 4,6\%$ (с максимумом и минимумом 8% и -5%, соответственно, а $\Delta S_{16}=2,5 \pm 3,3\%$ (с максимумом 7,1% и минимумом -3,6%). Таким образом, ниосомальный HNP-1 в концентрации 1 мкг/мл не имел достоверных отличий от контрольной группы (по ΔS_9 $p=0,7337$ и по ΔS_{16} $p=0,8206$). Следовательно, можно сделать вывод, что ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл не обладает ранозаживляющей и противомикробной активностью в модели инфицированной раны у крыс – это, вероятнее всего, связано с недостаточной концентрацией антимикробного пептида в лекарственной форме.

При лечении ниосомальным α -дефензином-1 в концентрации 2 мкг/мл (4 группа) в первые 5 дней лечения величина $\Delta S_9=11,6 \pm 2,9\%$, максимальное значение относительной убыли площади ран составляло 16%, а минимальное – 8%. В последующие 7 дней эксперимента $\Delta S_{16}=12,4 \pm 4\%$ с максимумом 14,3% и минимумом 2,9%. 4 группа имела достоверные отличия от контрольной группы как

с 4 по 9 ($p=0,0065$), так и с 9 по 16 ($p=0,0006$) дни эксперимента. Кроме того, ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл имел значимые отличия от «Левомеколя» по величине ΔS_9 ($p=0,00073$), однако с 9 по 16 день эксперимента достоверных отличий между 4 и 2 группами выявлено не было ($p=0,0588$).

В 5 группе (крысы получали ниосомальный β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл) величина относительной убыли площади ран с 4 по 9 день эксперимента составила $8,1 \pm 4,5\%$ (с максимумом 15% и минимумом 2,9%), а спустя 7 дней $\Delta S_{16} = 9,3 \pm 5,1\%$ (при этом максимальное значение ΔS_{16} составило 14,3%, а минимальное – 0%) – эти данные в целом аналогичны результатам, полученным при применении «Левомеколя»: ниосомальный hBD-1 в первые 5 дней лечения не имел достоверных отличий от контрольной группы ($p=0,0539$), однако в последующие 7 дней лечения значение ΔS_{16} значимо отличалось от 1 группы ($p=0,0052$). При сравнении со 2 группой не было выявлено достоверных отличий в величине относительной убыли площади ран как на 9 день ($p=0,1859$), так и на 16 день эксперимента ($p=0,8501$). При проведении статистического анализа были выявлены достоверные отличия в значении ΔS_9 при сравнении с 4 группой (ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл) ($p=0,0494$), однако с 9 по 16 день эксперимента (ΔS_{16}) значимых отличий не было ($p=0,0890$).

Таким образом, при вычислении величины относительной убыли площади ран были получены результаты, в целом сходные с данными при вычислении линейной скорости заживления ран: наиболее эффективным из всех изученных препаратов оказался ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл; «Левомеколь» и ниосомальный β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл были также достаточно эффективны в равной степени (таблица 20).

Таблица 20 – Относительная убыль площади ран (%) с 4 по 9 (ΔS_9) и с 9 по 16 день (ΔS_{16}) эксперимента

Крыса	1 группа (контроль)		2 группа («Левомеколь»)		3 группа (HNP-1, 1 мкг/мл)		4 группа (HNP-1, 2 мкг/мл)		5 группа (hBD-1, 1 мкг/мл)	
	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}	ΔS_9	ΔS_{16}
1	-5,0	8,6	-6,7	10,7	-5,0	0,0	15,0	14,3	4,0	10,7
2	10,0	0,0	6,7	7,1	5,7	5,7	8,9	2,9	8,6	14,3
3	12,0	-7,1	0,0	9,5	0,0	0,0	12,0	14,3	3,3	14,3
4	-4,0	2,4	8,6	3,6	0,0	4,1	8,6	7,1	7,5	2,9
5	4,0	7,1	12,0	7,1	4,0	-3,6	12,0	14,3	2,9	9,5
6	-4,0	2,4	13,3	14,3	8,0	4,8	15,0	14,3	11,4	4,8
7	0,0	5,7	4,0	3,6	4,0	7,1	16,0	14,3	8,6	10,7
8	10,0	0,0	0,0	14,3	5,0	0,0	10,0	14,3	15,0	14,3
9	2,5	2,0	-2,9	12,5	8,0	4,8	10,0	14,3	15,0	0,0
10	-8,0	-2,0	6,7	10,7	-4,0	2,4	8,0	14,3	5,0	11,9

5.4.3. Сравнение процентной скорости заживления ран

Процентная скорость заживления (регенерации) ран (w , %) была рассчитана по формуле (3) с 4 по 9 день эксперимента – на 5 сутки лечения (w_9) и с 9 по 16 день эксперимента – на 12 сутки с момента начала лечения (w_{16}). При расчете данной величины во всех группах, кроме 3 (w_{16}), было получено нормальное распределение, в этой связи для сравнения несвязанных выборок использовался критерий Манна-Уитни.

В 1 группе w_9 составила $8,8 \pm 35,6\%$, причем максимальное значение w_9 – 60%, а минимальное – -40%. В следующие 7 дней эксперимента процентная скорость заживления ран не имела достоверных отличий ($p=0,105$) – $w_{16}=25,5 \pm 36,5\%$ (максимум 60%, минимум 60%).

У крыс, получавших «Левомеколь» (2 группа), $w_9=20,9 \pm 32,4\%$ (с максимальной $w_9=66,7\%$ и минимальной $w_9=-33,3\%$), что не имело достоверных отличий от w_9 в 1 группе ($p=0,4057$). Но с 9 по 16 день эксперимента процентная

скорость заживления ран достоверно выросла по сравнению с w_9 ($p=0,001$) и составила $w_{16}=74,6\pm 18,9\%$, что имеет статистически значимые отличия от w_{16} контрольной группы ($p=0,0009$).

В 3 группе применение ниосомального HNP-1 в концентрации 1 мкг/мл привело к следующим результатам: $w_9=12,9\pm 23,1\%$ (максимум 40%, минимум -25%) и $w_{16}=26,6\pm 31,7\%$ (максимум 60% и минимум -25%). Статистический анализ показал, что при сравнении с контрольной группой не было значимых отличий как в первые 5 ($p=0,7337$), так и в последующие 7 дней лечения ($p=0,8798$).

В 4 группе (ниосомальный HNP-1, 2 мкг/мл) при вычислении величины процентной скорости заживления ран были получены следующие результаты: $w_9=57,7\pm 14,7\%$ (максимум 80%, минимум 40%), что имело достоверные отличия от w_9 в 1 ($p=0,0065$), 2 ($p=0,0073$) и 3 групп ($p=0,0002$). В последующие 7 дней эксперимента $w_{16}=92,7\pm 15,8\%$ (максимум 100%, минимум 55,6%), что также достоверно отличалось от 1 ($p=0,0002$), 2 ($p=0,0343$) и 3 групп ($p=0,0005$).

5 группа продемонстрировала следующие цифры: $w_9=40,6\pm 22,6\%$ (максимум 75%, минимум 14,3%). Несмотря на высокие цифры w_9 5 группы достоверно не отличалась от контроля ($p=0,0539$) и 2 группы ($p=0,1859$) и значимо отличалась от 4 группы ($p=0,0494$). Однако с 9 по 16 день эксперимента w_{16} составила $82,1\pm 16\%$ (с максимальным значением 100% и минимальным 50%), что имело статистически значимые отличия от 1 ($p=0,0003$) и 3 групп ($p=0,0005$) и не имело отличий от 2 ($p=0,2899$) и 4 групп ($p=0,1124$). Результаты измерения процентной регенерации ран представлены на рисунке 13.

Тем самым, вычисление величины процентной скорости заживления ран подтвердило результаты других вычислений (линейной скорости заживления ран и относительной убыли площади ран): ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл никак не влиял на заживление ран, инфицированных золотистым стафилококком. «Левомеколь» и ниосомальный β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл ускоряли регенерацию ран (в промежутке с 9 по 16 день эксперимента) и

были одинаково эффективны. Из всех исследованных препаратов наибольшей эффективностью обладал ниосомальный HNP-1 в концентрации 2 мкг/мл, который ускорял заживление ран уже в первые 5 дней лечения.

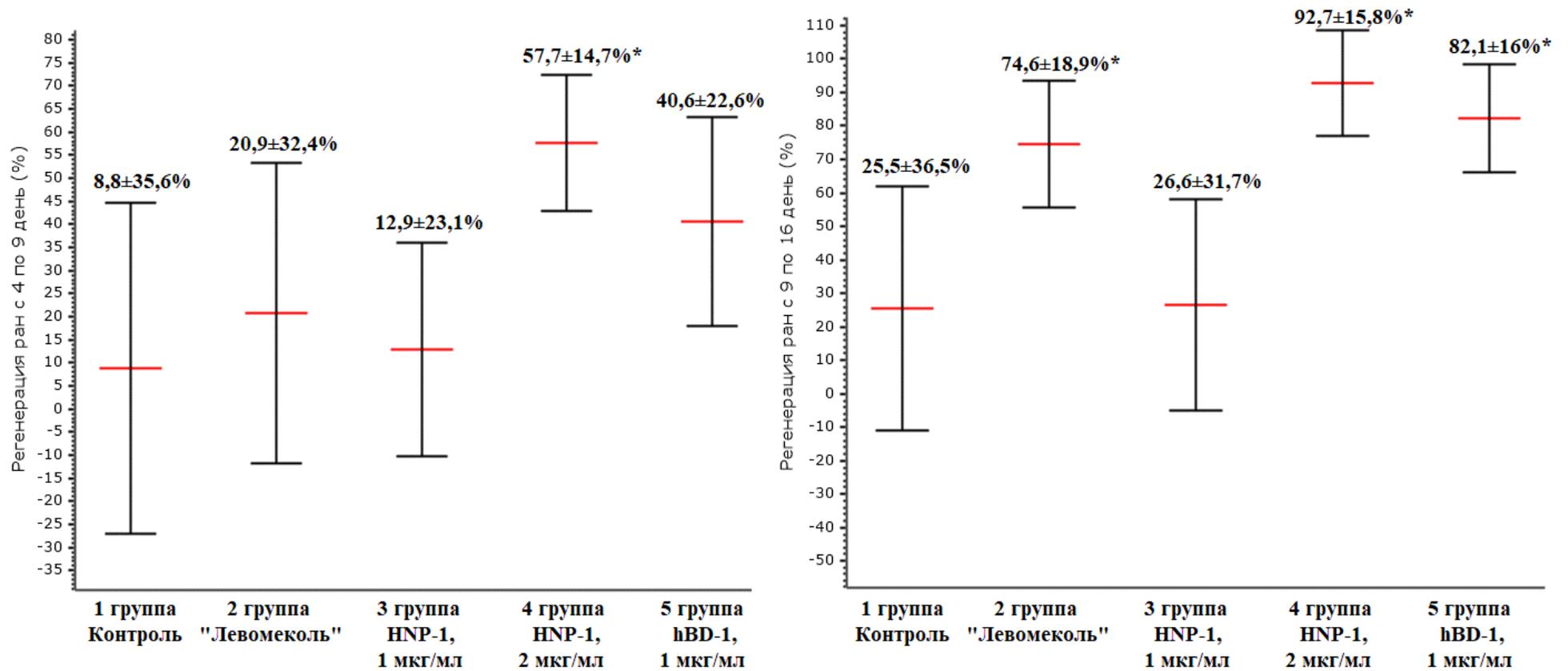


Рисунок 13. Процентная скорость заживления ран (%). Красные линии – среднее арифметическое, черные линии – стандартное отклонение (\pm SD); * – достоверные отличия от контрольной группы при $p < 0,05$.

5.5. Заключение

При изучении возможности действия дефензинов на компоненты клеточной стенки бактерий методами компьютерной химии и молекулярного докинга было показано, что в модели комплексного взаимодействия «HNP-1-пептигликаны» дефензины способны активно взаимодействовать с данным компонентом клеточной стенки бактерий, что демонстрирует еще один вероятный механизм противомикробного действия антимикробных пептидов.

Для более глубокого анализа действия дефензинов на клетки золотистого стафилококка была использована высокоразрешающая атомно-силовая микроскопия. По данным АСМ, бета-лактамы антибиотики (в частности, цефотаксим) вызывают образование неровностей на поверхности *S. aureus* в виде выпячиваний и изменений «шероховатости» клеточной стенки. А дефензины (в частности, HNP-1) вызывают массивное разрушение клеточной стенки золотистого стафилококка, что реализуется за счет создания линейных разрывов по всему диаметру микробных клеток, что связано с электростатическим взаимодействием положительно заряженного антимикробного пептида и отрицательно заряженного билипидного слоя.

При исследовании противомикробной активности HNP-1 и hBD-1 *in vitro* было показано, что минимальная подавляющая концентрация (МПК) α -дефензина-1 в отношении клинических штаммов MSSA и MRSA одинакова и составляет 1 мкг/мл. МПК β -дефензина-1 также идентична в отношении данных микроорганизмов и составляет 0,5 мкг/мл.

При совместном использовании дефензина (HNP-1 или hBD-1) с цефотаксимом против MSSA противомикробный эффект данных веществ аддитивно складывается. Аналогичная картина наблюдается при комбинации дефензинов между собой в отношении MSSA. При использовании комбинации HNP-1 + hBD-1 против MRSA дефензины никак не влияют на антимикробную активность друг друга.

Для защиты дефензинов от гидролитических ферментов и, соответственно, увеличения их продолжительности действия возможно использование метода инкапсулирования HNP-1 и hBD-1 в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы). По данной методике были получены лекарственные формы в виде гелей для наружного применения, содержащие HNP-1 и hBD-1.

Гель для наружного применения, содержащий ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл (вдвое выше МПК), при использовании 1 раз в сутки ускорял заживление инфицированных золотистым стафилококком ран у крыс уже в первые 5 дней лечения по сравнению с остальными исследованными препаратами. Ниосомальный гель, содержащий β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл (вдвое выше МПК), при использовании 1 раз в сутки ускорял заживление инфицированных золотистым стафилококком ран у крыс в промежутке с 6 по 12 день лечения, что сопоставимо с мазью «Левомеколь» (метилурацил+хлорамфеникол).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе диссертационного исследования у 748 пациентов с синдромом диабетической стопы, находившихся на стационарном лечении, был произведен забор отделяемого из гнойно-некротических язв с целью идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к противомикробным препаратам.

В общей сложности из диабетических язв был выделен 851 штамм микроорганизмов. Среди грамположительных бактерий в монокультуре чаще всего выявлялись *S. aureus* – 36,9% и *Enterococcus spp.* – 18,9%. Состав грамотрицательных бактерий был представлен в основном энтеробактериями – 22,6%. Кроме того, в монокультуре в 11,5% случаев была выделена *P. aeruginosa*. В ассоциациях наиболее часто встречались следующие комбинации: *E. faecalis* с *Enterobacteriaceae* – 33,5%; *S. aureus* с *E. faecalis* – 23,1%; *S. aureus* с *Enterobacteriaceae* – 17,9%. Грамотрицательные бактерии были представлены: *Enterobacteriaceae* – 68,6%, среди которых *E. coli* – 27,2%, *Proteus spp.* – 20,2%, *K. aerogenes* – 11,9%, *K. pneumoniae* – 7,4%. Среди грамотрицательных бактерий в 25% случаев была выделена *P. aeruginosa* и в 6,4% случаев – *A. baumannii*.

Схожие данные были опубликованы в различных исследованиях в России и в зарубежной литературе – на первом месте в структуре микрофлоры повсеместно преобладают штаммы золотистого стафилококка [6, 32, 82, 85].

Чтобы отследить динамику процесса, представлялось интересным сравнить полученные результаты структуры микроорганизмов при СДС с данными десятилетней давности на территории Ставропольского края. Так, в 2006 г. в монокультуре у 52,9% пациентов обнаруживалась грамположительная флора, а у 48,1% пациентов – грамотрицательная. Среди грамположительных бактерий наиболее часто встречались *Staphylococcus spp.* – 42,6%, а среди

грамотрицательных преобладали штаммы *Enterobacteriaceae* – 48,1%. Значительно реже обнаруживались стрептококки, *P. aeruginosa* и другие микроорганизмы. При этом синегнойная палочка была выделена исключительно как компонент микробных ассоциаций. Чаще всего обнаруживались ассоциации стафилококков с энтеробактериями (43,5%) и стрептококков с *Enterobacteriaceae* (29,3%) [11].

Анализ чувствительности микроорганизмов в 2006 г. показал, что среди *S. aureus* 31% составили штаммы MRSA. *Enterobacteriaceae* имели низкий уровень чувствительности к аминопенициллинам (19%), к первому поколению цефалоспоринов (30,8%). Чувствительность к цефалоспоринов третьего поколения (цефотаксим) составила 63%. Высокий уровень чувствительности отмечался к цефепиму – 93%, имипенему/меропенему – 93%. [11].

Активность аминогликозидов различалась. К гентамицину было чувствительно 26% штаммов, а к амикацину – 75%. Крайне низкой была чувствительность к хлорамфениколу – 8%. Чувствительность к ципрофлоксацину составила 67% [11].

Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из язв у больных с СДС, были чувствительны к карбапенемам (имипенем/меропенем) в 96% случаев. Высокой эффективностью характеризовались цефалоспорины III-IV поколений: чувствительность к цефоперазону была 88%, цефтазидиму – 96%, цефепиму – 91%. К аминогликозидам чувствительность составляла для гентамицина – 32%, для амикацина – 81%. К ципрофлоксацину было выделено 76% чувствительных штаммов [11].

Данные, полученные в ходе диссертационного исследования, т. е. спустя 10 лет, продемонстрировали серьезнейшую проблему прогрессирующей резистентности микроорганизмов, выделяемых из язвенно-некротических очагов у пациентов с СДС.

В ходе работы было показано, что уже 42,5% штаммов золотистого стафилококка были не чувствительны к метициллину (MRSA). По отношению к

энтерококкам наиболее активными были ванкомицин и ампициллин – 100% и 94,4% чувствительных штаммов соответственно. Энтеробактерии, как и 10 лет назад, имели низкий уровень чувствительности к пенициллинам. Чувствительность кишечной палочки к ампициллину составляла 25,9%. Даже амоксицилин/клавуланат был эффективен только в отношении 48,2% штаммов.

Особенно ярко прослеживалось снижение чувствительности к цефепиму – 40%. Высокорезультативные 10 лет назад карбапенемы утратили свою былую эффективность. Обнаружено только 56,5% штаммов *E. coli*, чувствительных к имипенему/меропенему. Практически единственный антибиотик цефоперазон/сульбактам эффективно подавлял *E. coli*, чувствительность к нему составила 96,5%.

Серьезную клиническую проблему в последние 10 лет стали представлять штаммы *K. aerogenes* и *K. pneumoniae* – их чувствительность к меропенему/имипенему составила 54,1% и 34,5% соответственно. Наиболее эффективным препаратом в отношении данных бактерий оказался цефоперазон/сульбактам – 97,3% и 91,3% чувствительных штаммов соответственно. Схожая ситуация наблюдалась и с ранее редким *Proteus spp.*, имевшим низкую чувствительность к цефалоспорином III поколения.

Антибиотикочувствительность *P. aeruginosa* существенно изменилась за 10 лет. Особенно заметно снизилась эффективность цефалоспоринов – чувствительность к которым составила: к цефоперазону 48,7%, к цефтазидиму – 43,6%, к цефепиму – 50%. Снизилась чувствительность к имипенему/меропенему – 62,8%. В 3 раза снизилась эффективность амикацина – до 73%. Высокую эффективность сохранял цефоперазон/сульбактам – 98,7% чувствительных штаммов.

Вызывает беспокойство довольно низкая эффективность антибиотиков в отношении *A. baumannii*. Так, к цефоперазону/сульбактаму были чувствительны 75% штаммов, к имипенему/меропенему – 60%.

Неуклонно снижающаяся чувствительность микроорганизмов к современным противомикробным препаратам требует проведения исследований, позволяющих подобрать адекватную антибиотикотерапию. Кроме того, изучение структуры микрофлоры и ее чувствительности необходимо для экономического прогнозирования и рациональной организации медицинской помощи. Данные, полученные в ходе диссертационного исследования, согласуются с результатами других исследований, где отмечается повсеместное увеличение доли штаммов, устойчивых к противомикробным препаратам при самых разных инфекциях [10, 16, 21, 36, 132].

Таким образом, в составе микроорганизмов при СДС преобладают *S. aureus*, причем за последние 10 лет увеличилась доля MRSA (42,5%). Кроме того, за 10 лет увеличилась доля *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa* и *Enterobacteriaceae*, включая *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* и *Proteus spp.* Значительно снизилась чувствительность микроорганизмов к цефалоспорином и карбапенемам за счет увеличения доли микроорганизмов, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра действия и, вероятно, карбапенемазы. Стали выделяться штаммы *A. baumannii*, имеющие слабую чувствительность к цефалоспорином и карбапенемам.

Следует отметить, что исследование анаэробной микрофлоры не проводилось в связи с тем, что пациенты обследовались и получали лечение в рамках системы обязательного медицинского страхования. Кроме того, с позиции прогноза заболевания, это является не столь актуальным, так как эмпирическое назначение метронидазола позволяет полностью покрыть спектр анаэробных возбудителей [25].

Большинство пациентов с обострением СДС нуждаются в проведении системной антибиотикотерапии [123]. Вместе с тем, в соответствии с клиническими рекомендациями и стандартами оказания медицинской помощи при данном заболевании в зависимости от тяжести процесса показано применение средств для наружного применения [3, 4, 15]. Действительно, опубликованные клинические испытания показывают, что лечение системными

противомикробными средствами не всегда улучшает прогноз у данных пациентов, т. к. из-за нарушений иммунного статуса и микроциркуляции препараты не позволяют добиться необходимой эффективности [56, 66, 90]. Доступные к использованию средства для наружного применения не обеспечивают достаточного эффекта ввиду высокой резистентности. В ходе исследования было установлено, что чувствительность *S. aureus* к хлорамфениколу (входит в состав мази «Левомеколь») составляет всего 41%. Более того, еще одной причиной неэффективности фармакотерапии СДС может являться формирование биопленок [86], что играет немаловажную роль в персистенции инфекционных агентов в язвенно-некротических очагах.

Для решения всех данных проблем, вероятно, представляется целесообразным в дополнение к системной терапии разрабатывать новые препараты для наружного применения. Однако следует учитывать, что эти препараты должны глубоко проникать в гнойно-некротический очаг и обладать не только противомикробным, но и ранозаживляющим эффектом.

Проведенный анализ состава микрофлоры и ее антибиотикочувствительности позволил наметить стратегию борьбы с растущей резистентностью микроорганизмов в части рационального использования системных противомикробных препаратов. Для поиска альтернативных способов терапии СДС представлялось интересным исследовать механизмы врожденного иммунитета, направленные на элиминацию патогенов из очага инфекции и регенерацию язвенных поражений и на основе полученных данных попытаться разработать новые подходы к фармакотерапии данного заболевания.

Для этого было изучено влияние антимикробных пептидов (дефензинов) на эффективность терапии и исследовано их возможное участие в формировании иммунных ответов при СДС. У 20 больных был произведен забор крови при поступлении в стационар, а также после проведенного лечения с целью определения концентраций α -дефензина-1 и β -дефензина-1. При поступлении в стационар у пациентов были обнаружены более высокие уровни HNP-1 и hBD-1 по

сравнению с нормальными значениями данных пептидов у здоровых лиц. После проведенного лечения уровень антимикробных пептидов в крови достоверно снижался, но не достигал нормальных значений. Что касается α -дефензинов, полученные данные в целом согласуются с результатами Németh В. С. и соавторов [42], которые показали, что HNP-1 имеет высокие уровни у пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типов, причем чем больше выраженность осложнений диабета, тем выше уровень α -дефензинов (наибольшие уровни HNP-1 определялись при нефропатии – $49,4 \pm 4,8$ нг/мл, нейропатии – $38,7 \pm 4,8$ нг/мл и сердечно-сосудистых осложнениях – $45,6 \pm 1,45$ нг/мл). Других исследований, оценивающих связь между уровнем α -дефензинов и осложнениями сахарного диабета, не проводилось. Что касается hBD-1, то по результатам анализа литературы удалось найти также одну работу, косвенно подтверждающую результаты диссертационного исследования. Так, Rivas-Santiago В. и коллеги анализировали биоптаты, полученные из диабетических язв, было показано, что в полученном биологическом материале экспрессия всех β -дефензинов и α -дефензина-1 повышена по сравнению со здоровыми лицами [161].

Все больше находится подтверждений участия антимикробных пептидов как в системных патологических процессах, так и в процессах регенерации поврежденных тканей [49, 77, 83, 108, 166, 176, 177]. Ранее было показано, что α - и β -дефензины обладают хемотаксическим и ранозаживляющим действием [49, 77, 83], реализуют воспалительный ответ, реэпителизацию и ангиогенез. В дополнение к этому β -дефензины в ране индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов, миграцию клеток и васкулогенез [166].

Таким образом, повышенные уровни дефензинов у пациентов с СДС вероятнее всего являются факторами защиты: во-первых, экспрессия дефензинов направлена на уничтожение микробной флоры и препятствует генерализации инфекции; во-вторых, дефензины за счет своих ранозаживляющих свойств способствуют регенерации поврежденных тканей. Очевидно, что то количество вырабатываемых организмом дефензинов недостаточно для того, чтобы организм

справился с гнойно-некротическим процессом. К примеру, при сепсисе уровень дефензина HNP-1 может повышаться до 170000 нг/мл [148], что в 4 тысячи раз выше, чем при СДС. Кроме того, данные Батурина В. А. и Бошян Р. О. демонстрируют, что чем выше уровень β -дефензинов, тем менее выражен воспалительный процесс [12], т. е. можно предполагать, что высокая концентрация антимикробных пептидов, возможно, определяет лучший прогноз. Хотя, с другой стороны, возможно, создаваемых организмом при СДС концентраций антимикробных пептидов и было бы достаточно, но, как известно, дефензины быстро разрушаются протеазами [147], что приводит к их инактивации.

Основываясь на данных, полученных в ходе диссертационного исследования, представлялось интересным исследовать возможность использования дефензинов HNP-1 и hBD-1 в качестве местных противомикробных и ранозаживляющих лекарственных препаратов. Целесообразность и возможность местного применения антимикробных пептидов уже подтверждены некоторыми исследованиями. На сегодняшний день уже опубликованы результаты двойного-слепого плацебо-контролируемого клинического исследования, в котором у пациентов с венозными трофическими язвами использовался препарат для наружного применения, содержащий антимикробный пептид LL-37. Данный препарат в концентрации 0,5 мг/мл продемонстрировал шестикратное ускорение скорости заживления язв по сравнению с плацебо [54], однако проблема быстрого разрушения пептида протеазами осталась неразрешенной. Кроме того, сложность использования данного пептида в клинической практике обусловлена высокой стоимостью синтеза пептида LL-37, а дефензины, напротив, могут быть получены путем выделения и очистки из клеток крови человека, что значительно удешевляет их производство [147]. Считается, что, помимо прямого антимикробного эффекта, эффективность LL-37 связана с его свойствами защищать кератиноциты от апоптоза (опосредованного через циклоксигеназу-2) и способностью увеличивать продолжительность жизни нейтрофилов [54, 139]. Результаты применения LL-37 в клинике подтверждают возможность успешного применения антимикробных

пептидов не только в классических инфицированных ранах, но и в вялотекущих хронических раневых процессах. Однако при использовании дефензинов *in vivo* нужно учитывать, что, к примеру, только в раневом экссудате идентифицировано более 100 эндогенных протеаз, таких как металлопротеиназы и нейтрофильная эластаза, а также бактериальных ферментов, таких как протеиназа V8 *S. aureus* [103]. Так, недавнее клиническое исследование антимикробного пептида омиганана потерпело неудачу из-за его быстрой деградации протеазами кожи [158].

Для изучения возможности наружного применения HNP-1 и hBD-1 для лечения раневых процессов сначала было необходимо изучить характер и выраженность противомикробного действия дефензинов на *S. aureus*, являющийся наиболее частым микроорганизмом при СДС и инфицированных ранах. Для решения этой задачи сначала было проведено компьютерное моделирование взаимодействия дефензина HNP-1 и пептидогликана. После чего для подтверждения и визуализации полученных данных была проведена атомно-силовая микроскопия, оценивающая характер повреждений клеток золотистого стафилококка при взаимодействии с дефензинами (в сравнении с бета-лактамым антибиотиком цефотаксимом).

Так как существует несколько моделей, согласно которым антимикробные пептиды реализуют свой противоинфекционный эффект, напрямую повреждая стенку микробных клеток (пермеабилитация) [147], представлялось интересным изучить возможность взаимодействия дефензинов с пептидогликаном, являющимся основным компонентом клеточной стенки бактерий [35].

Компьютерное моделирование с применением методики молекулярного докинга показало, что дефензин глубоко проникает в структуру фрагмента молекулы пептидогликана; соединение «HNP-1 – пептидогликан» является нестойким, и взаимодействие данных молекул может приводить к нарушению целостности клеточных стенок, а следовательно, можно было ожидать выраженного бактерицидного эффекта дефензинов.

Для подтверждения данного предположения, а также с целью сравнения характера действия дефензинов и АБП, используемых в клинической практике, был использован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющий визуализировать биологические объекты с высокой разрешающей способностью [23, 46].

Действительно, по данным АСМ, оказалось, что клетки *S. aureus* определялись как объекты сферической формы с наличием морфологически выраженных повреждений (имеющих вид разрубленных или рассеченных шарообразных структур), видимых по всей протяженности *S. aureus*. Следовательно, HNP-1 приводит к массивному повреждению клеточной стенки за счет встраивания молекул α -дефензина-1 во внешнюю поверхность липидного бислоя. При повышении концентрации HNP-1 до 5 мкг/мл в поле сканирования определялось меньшее количество целых клеток, а повреждения носили еще более выраженный характер. Полученные данные подтверждают предположения Sengupta D. и соавторов, что при достижении определенной пороговой концентрации молекул антимикробных пептидов на наружной поверхности липидной мембраны бактериальной клетки происходит компенсация тангенциального напряжения, которая в конечном итоге приводит к образованию пор различного строения [172].

Данные целого ряда работ свидетельствуют, что многие из AMPs после проникновения в мембрану патогена подвергаются агрегации. При встраивании молекул HNP-1 во внешнюю поверхность липидного бислоя возникает тангенциальное напряжение между наружной и внутренней поверхностями липидного бислоя. По результатам других исследований с применением АСМ, разрушение бактериальных клеток может реализовываться по различным механизмам: путем перераспределения молекул пептида между наружной и внутренней поверхностями мембраны, образования пор различного строения или разрушения липидной мембраны [119, 172].

При взаимодействии клеток золотистого стафилококка с бета-лактамым антибиотиком цефотаксимом, по данным АСМ, в поле сканирования количество бактериальных клеток значительно уменьшилось. Было определено наличие морфологически аномальных изменений на поверхности бактериальных клеток – выраженная шероховатость *S. aureus* сопровождалась наличием множественных выпячиваний поверхности клеток и расположением гранулярных структур вокруг наружной поверхности микробов, являющихся, по всей видимости, фрагментами пептидогликана. Эти данные согласуются с результатами других работ, в которых изучалось действие бета-лактамыных антибиотиков на бактериальную клетку на иных микроорганизмах (грамотрицательные палочки) [33, 37].

Таким образом, по данным АСМ, цефотаксим и HNP-1 имели разный механизм бактерицидного действия на *S. aureus*. β -лактамыный антибиотик вызывает образование неровностей на поверхности в виде выпячиваний и изменений шероховатости клеточной стенки, что, вероятно, связано с ингибированием синтеза пептидогликана. HNP-1 вызывает массивное разрушение клеточной стенки – это реализуется за счет создания трещин в липидной мембране, что связано с электростатическим взаимодействием положительно заряженного антимикробного пептида и отрицательно заряженного билипидного слоя.

Результаты исследования механизма противомикробного действия дефензина HNP-1 могут быть экстраполированы на hBD-1 и использованы в целях разработки лекарственных препаратов на основе данных антимикробных пептидов.

Однако для того, чтобы выбрать необходимые дозировки и концентрации средств на основе дефензинов, было необходимо определить их минимальные подавляющие концентрации (МПК) против золотистого стафилококка, а также возможные эффекты синергизма/антагонизма с антибиотиками, используемыми в клинической практике. Для решения этой задачи был использован метод серийных разведений, являющийся золотым стандартом при разработке новых противомикробных препаратов [134, 146]. Было показано, что антимикробные пептиды HNP-1 и hBD-1 имеют выраженную антистафилококковую активность

против MSSA и MRSA. МПК α -дефензина-1 против обоих штаммов составила 1 мкг/мл. β -дефензин-1 имел меньшую МПК против данных микроорганизмов – 0,5 мкг/мл. МПК цефотаксима по отношению к MSSA составила 2 мкг/мл; по отношению к MRSA МПК цефотаксима не определялась ввиду природной резистентности, связанной с геном *tesA*, кодирующим мутантный пенициллин-связывающий белок PBP2a, не чувствительный к связыванию с метициллином и другими бета-лактамами АБП [99].

Тот факт, что значения МПК каждого дефензина одинаковы против метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных штаммов *S. aureus*, вероятно, свидетельствует о том, что пенициллин-связывающие белки (ПСБ), по всей видимости, не являются мишенями данных антимикробных пептидов – дефензины одинаково эффективны против как MSSA, так и MRSA. С этой позиции в перспективе дальнейших исследований представляется интересным исследовать возможные структурные взаимодействия между различными формами ПСБ и различными дефензинами, так как в последнее время, кроме классического механизма действия антимикробных пептидов (прямое повреждение стенки микроорганизмов – пермеабилзация [147]), находятся и альтернативные способы реализации противомикробного действия: к примеру, подавление дефензином HNP-1 липида II – предшественника в синтезе клеточной стенки [117].

При исследовании совместного бактерицидного действия антимикробных пептидов с цефотаксимом, при расчете индексов фракционной подавляющей концентрации (иФПК) было показано, что комбинации HNP-1 + цефотаксим и hBD-1 + цефотаксим в отношении MSSA обладают аддитивным действием – т. е. антистафилококковый эффект дефензинов и цефотаксима аддитивно складывается – бактерицидная концентрация каждого из исследуемых агентов снижается в 2 раза: цефотаксим – 1 мкг/мл, HNP-1 – 0,5 мкг/мл, hBD-1 – 0,25 мкг/мл. Аналогичный эффект наблюдается и при совместном использовании α -дефензина-1 и β -дефензина-1 против MSSA. Схожие данные были получены Жарковой М. С. [19] – по результатам исследования комбинации рифампицин + β -дефензин-3 и

рифампицин + α -дефензин-1 обладали синергетическим действием против MRSA, а следующие комбинации продемонстрировали аддитивный эффект: рифампицин + HNP-4, рифампицин + лизоцим, полимиксин В + hBD-3/лизоцим, гентамицин + HNP-1/HNP-4, гентамицин + hBD-3/лизоцим, офлоксацин + HNP-1/HNP-4/hBD-3/лизоцим, оксациллин+HNP-1/hBD-3/лизоцим. Интересен тот факт, что в данном исследовании использование α -дефензина-1 или β -дефензина-3 в комбинации с оксациллином позволило преодолеть природную резистентность MRSA к бета-лактамам. Исследование Коррен В. С. и соавторов показало, что антимикробный пептид LL-37 при сочетанном применении с тейкоплакином обладает синергизмом против MRSA, а также данная комбинация уничтожает бактерии *S. aureus*, находящиеся в биоплёнках [107].

Кроме того, интересно, что комбинация α -дефензина-1 с β -дефензином-1 против MRSA имела ИФПК=1,5 – это свидетельствует о том, что данные пептиды никак не влияют на антистафилококковую активность друг друга. Вероятно, эти данные можно объяснить схожим механизмом действия антимикробных пептидов [147].

Данные, полученные в ходе экспериментов *in vitro* позволили перейти к разработке концепции применения дефензинов в экспериментальной модели раневой инфекции – были подобраны оптимальные концентрации вдвое превышающие значения МПК против клинических штаммов золотистого стафилококка: HNP-1 – 2 мкг/мл и hBD-1 – 1 мкг/мл. А также было решено использовать дефензин HNP-1 в концентрации, равной МПК – 1 мкг/мл.

Впервые для предотвращения быстрого разрушения нативных антимикробных пептидов *in vivo* было предложено инкапсулировать их в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы) на основе ПЭГ-12 диметикона.

Для проведения экспериментов на животных было приготовлено 3 геля для наружного применения с антимикробными пептидами: ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл, ниосомальный β -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл

и ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 1 мкг/мл. Эффективность данных препаратов оценивалась в экспериментальной модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс и сравнивалась с мазью «Левомеколь» и контрольной группой (нативный ниосомальный гель без дефензинов).

По результатам исследования всех препаратов наибольшей эффективностью в первые 5 дней лечения обладал ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл, а остальные исследованные препараты не имели достоверных отличий друг от друга и от контрольной группы. В последующие 7 дней лечения ниосомальный HNP-1 (2 мкг/мл), ниосомальный hBD-1 (1 мкг/мл) и «Левомеколь» достоверно ускоряли регенерацию инфицированных ран и не имели статистически значимых отличий между собой. Что касается ниосомального α -дефензина-1 в концентрации 1 мкг/мл, то на всем протяжении лечения он не имел достоверных отличий от контрольной группы.

Эффективность исследованных дефензинов обусловлена их антимикробными, а также другими биологическими функциями. При образовании ран в первой, воспалительной, фазе преобладают процессы гемостаза и активная инвазия иммунных клеток, таких как нейтрофилы и макрофаги; вторая фаза включает формирование ткани с ангиогенезом и реэпителизацией, а третья фаза включает ремоделирование с активным синтезом коллагена [193]. Адекватное заживление раны является необходимым условием для поддержания гомеостаза кожи, поскольку невозможность регенерации может вызывать образование хронических ран, которые часто остаются в воспалительной фазе и трудно поддаются заживлению – например, хронические раны при СДС или при варикозном расширении вен нижних конечностей [95].

Presicce P. и соавторы показали, что HNP-1 и hBD-1 активируют хемотаксис дендритных клеток; оба дефензина способствуют активации и созреванию дендритных клеток из моноцитов путем положительной регуляции экспрессии поверхностных ко-стимуляторных молекул CD80, CD86 и CD40, а также путем созревания маркеров CD83 и HLA-DR; также данные антимикробные пептиды

усиливают продукцию провоспалительных цитокинов: ФНО- α , интерлейкина-6 и интерлейкина-12, но не влияют на продукцию регуляторного интерлейкина-10 [159]. В том же исследовании HNP-1 и hBD-1 способствовали активизации CD91 на поверхности дендритных клеток; CD91 представляет собой рецептор, который участвует в распознавании нескольких лигандов, включая и сами дефензины – это наводит на мысль, что дефензины могут усиливать свои собственные эффекты посредством активации аутокринной петли. ФНО- α и ИЛ-6 связывают врожденный и адаптивный иммунитет, а также участвуют в дифференцировке Т- и В-клеток [150, 182]. ИЛ-12 является многофункциональным цитокином, который действует как ключевой регулятор клеточного иммунного ответа через индукцию дифференцировки Т-хелперов Th-1; кроме того ИЛ-12, стимулирует продукцию γ -интерферона, пролиферацию и цитолитическую активность НК- и Т-клеток [121, 191]. Более того, антимикробные пептиды HNP-1 и hBD-1 активируют хемотаксис в очень низких концентрациях – порядка 10 нг/мл [198].

В последнее время появляется все больше экспериментальных данных, демонстрирующих эффективность различных антимикробных пептидов *in vivo*. Jacobsen F. и коллеги исследовали пролин-новиспирин G10 (P-новиспирин G10), который эффективно снижал микробное число в течение 3 дней в модели инфицированной *S. aureus* раны у свиней – высокая активность G10 приводила к гибели бактерий до деградации пептида ферментами [96]. Аналогичные результаты были получены при изучении рекомбинантного модифицированного пептида PXL150 в лечении MRSA- и *P. aeruginosa*-инфицированных ран и ожогов [47,138]. Другой синтезированный пептид, FI-PRPRPL-5, усиливал заживление MRSA-инфицированных ран по сравнению с антибиотиком мупироцином у мышей; кроме того, данный пептид также уменьшал среднее количество бактерий в ране, хотя и с менее выраженным эффектом, чем антибиотик, т.е. процесс регенерации в ранах связан не только с подавлением бактериального роста, но и очень важны другие биологические эффекты антимикробных пептидов – в данном случае FI-PRPRPL-5 снижал уровни провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-1 и ИЛ-6, тогда как

мупиноцин снижал только уровень ИЛ-6 [180]. В другом подобном исследовании было показано, что при местном применении 12-мерного пептида WR12 или 8-мерного пептида D-К8 сильно снижается микробное число в мышинной модели кожной MRSA-инфекции, причем степень снижения микробного числа была сравнима с местным применением фузидиевой кислоты или пероральным введением линезолида [135]. Кроме того, эти пептиды также снижали факторы воспаления ФНО и ИЛ-6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

Для увеличения продолжительности действия дефензинов при наружном применении *in vivo* α -дефензин-1 и β -дефензин-1 были инкапсулированы в кремнийорганические наноконтейнеры (ниосомы). Полученные препараты были исследованы в модели инфицированной золотистым стафилококком раны у крыс.

При этом ниосомальный α -дефензин-1 в концентрации 2 мкг/мл превосходил по эффективности традиционно используемый при раневой инфекции «Левомеколь», а также обеспечивал более быстрое разрешение инфекционного раневого процесса, чем ниосомальный гель с β -дефензином-1. «Левомеколь» и ниосомальный гель с β -дефензином-1 обладали аналогичной эффективностью.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

5. Минимальная подавляющая концентрация α -дефензина-1 в отношении клинических штаммов MSSA и MRSA (выделенных у пациентов с синдромом диабетической стопы) одинакова и составляет 1 мкг/мл. Минимальная подавляющая концентрация β -дефензина-1 в отношении данных микроорганизмов

составляет 0,5 мкг/мл. При совместном использовании дефензина (HNP-1 или hBD-1) с цефотаксимом против MSSA противомикробный эффект данных веществ аддитивно складывается. Аналогичная картина наблюдается при комбинации дефензинов между собой в отношении MSSA.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо осуществлять мониторинг состава и антибиотикорезистентности микрофлоры, выделяемой из гнойно-некротических очагов у пациентов с СДС. Эмпирическую антимикробную терапию СДС необходимо проводить с учетом локальных данных чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам.
2. Необходимо дальнейшее изучение роли антимикробных пептидов (дефензинов) при синдроме диабетической стопы.
3. Полученные результаты демонстрируют, что применение дефензинов HNP-1 и hBD-1 в качестве новых противомикробных и ранозаживляющих препаратов является перспективным. Необходимо дальнейшее исследование эффекта данных антимикробных пептидов в отношении других патогенов, а также представляется целесообразным оценить возможность применения дефензинов в качестве системных АБП. Кроме того, представляется интересным изучить эффективность полученных ниосомальных гелей не только у пациентов с СДС, но и при ожогах и трофических язвах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП – антибактериальный препарат

иФПК – индекс фракционной подавляющей концентрации

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ПСБ – пенициллин-связывающие белки

СДС – синдром диабетической стопы

AMPs – антимикробные пептиды

HNP-1 – α -дефензин-1 (нейтрофильный пептид человека 1)

hBD-1 – β -дефензин-1

MSSA – метициллин-чувствительные штаммы золотистого стафилококка

MRSA – метициллин-резистентные штаммы золотистого стафилококка

RMS – среднеквадратичная «шероховатость»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 № 97 "Об Основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу" [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201903110045> (Дата обращения: 29.04.2019).
2. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 30.03.2019 № 604-р "Об утверждении Плана мероприятий на 2019 - 2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года" [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201904090021> (Дата обращения: 29.04.2019).
3. Приказ Минздрава России от 28.12.2012 N1620н "Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при сахарном диабете с синдромом диабетической стопы (критическая ишемия)" (Зарегистрировано в Минюсте России 07.03.2013 N27560) [Электронный ресурс].- Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_146163/ (Дата обращения: 20.04.2019).
4. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом/ Под ред. И.И.Дедова, М.В.Шестаковой, А.Ю. Майорова.- Вып. 8.- М.: УП ПРИНТ, 2017.

5. Аль Зубейди, А.Ф. Оценка ранозаживляющей активности L- и D-изоформ аскорбиновой кислоты и их солей с хитозаном на модели ожоговой раны у крыс/ А.Ф. Аль Зубейди, О.Н.Малинкина, И.В. Зудина, Я.О. Ковалева [и др.]// Современные проблемы науки и образования.- 2016.- № 6.- С. 233-236.
6. Абдурахманов, А.К. Особенности применения антибиотиков для терапии синдрома диабетической стопы в стационаре/ А.К. Абдурахманов, В.Д. Бабаев, А.И.Левитан, Д.Е. Новиков [и др.]// Фармакоэкономика: теория и практика.- 2018.- Т. 6.- № 1.- С. 41.
7. Базиков, И.А. Изучение гепатотоксичности ниосомальной формы доксорубина/ И.А. Базиков, Э.В. Бейер, А.Н. Мальцев, Е.А. Гоптарева [и др.]// Медицинский вестник Северного Кавказа.- 2016. - Т. 11.- № 4. - С. 525.
8. Базиков, И. А. Разработка фармацевтического противоопухолевого геля с ниосомальным доксорубином/ И. А. Базиков, Е. В. Чекрыгина, И. В. Климанович, А. Н. Мальцев// Медицинский вестник Северного Кавказа.- 2015.- Т. 10.- № 2.- С. 163-166.
9. Базиков, И.А. Сравнительная оценка острой токсичности доксорубина и его ниосомальной формы/ И.А. Базиков, Э.В. Бейер, В.В. Лукинова, А.Н. Мальцев// Медицинский Вестник Северного Кавказа.- 2015.-Т. 10.- №4. - С. 403-406.
10. Батулин, В.А. Бюллетень антибиотикорезистентности респираторных патогенов в ОИТАР г. Ставрополя/ В.А. Батулин, Е.В. Щетинин, И.Ф. Демиденко, О.Н. Кораблева [и др.]. - Ставрополь: СтГМУ, 2014. - 24 с.
11. Батулин, В.А. Изменение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным средствам у больных с синдромом диабетической стопы за последние 10 лет/ В.А. Батулин, А.Д. Болатчиев, О.В. Зинченко,

- М.В. Батурина [и др.]// Вестник современной клинической медицины.- 2017.- Т. 10, Вып. 5.- С. 12-15.
12. Батурин, В.А. Оценка уровня антимикробных пептидов у женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями органов малого таза, проходящих лечение в поликлинике/ В.А. Батурин, Р.О. Бошян// Медицинский вестник Северного Кавказа.- 2019.-№2.-С. 322-324.
13. Батурин, В. А. Состав микроорганизмов, выделяемых из мокроты у больных с инфекциями нижних дыхательных путей, и их чувствительность к антибактериальным средствам в зависимости от возраста пациентов, диагноза и предшествующего лечения/ В. А. Батурин, Ф. Т. Малыхин, Е. В. Щетинин// Профилактическая и клиническая медицина.- 2012.- № 2.- С. 48-51.
14. Ворожцова Е.В. Усиление иммуногенности плазмидной ДНК, экспрессирующей белок Gag вируса иммунодефицита человека, при ко-трансфекции плазмидой, несущей ген дефенсина-2 β / Е. В. Ворожцова, И. В. Духовлинов, Н. А. Климов, А. П. Козлов// Вестник СПбГУ.- 2010. - Т. 3 - № 4.- С. 108-116.
15. Галстян, Г.Р. Клинические рекомендации по диагностике и лечению синдрома диабетической стопы/ Г.Р. Галстян, А.Ю. Токмакова, Д.Н. Егорова, В.А. Митиш [и др.]// Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. Б.М. Костюченко.- 2015.- Т. 2.- №3.- С. 63-83.
16. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции/ В.В. Гостев, С.В. Сидоренко// Журнал инфектологии.- 2010.- Т. 2.- №3.- С. 4-15.
17. Григорьян, А.Ю. Морфологическое обоснование применения некоторых антисептиков в лечении ран/ А.Ю. Григорьян, А.И.Бежин, Т.А.Панкрушева, Е.В. Кобзарева [и др.]// Медицинский вестник Северного Кавказа.- 2015. - Т.10. - № 3. - С. 292-295.

18. Жаркова, М.С. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения (обзорная статья)/ М.С. Жаркова, Д.С. Орлов, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова// Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология.- 2014.- № 1.- С. 98-114.
19. Жаркова, М.С. Синергизм антибактериального действия антимикробных пептидов и конвенциональных антибиотиков/ М.С. Жаркова// Российский иммунологический журнал.- 2014.- Т. 8.- №17.- № 3.- С. 792-795.
20. Зубков, М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований/ М.Н. Зубков// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2004.- № 2.- С. 143-154.
21. Козлов, Р.С. Динамика резистентности *Streptococcus pneumoniae* к антибиотикам в России за период 1999–2009 гг. (Результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС)/ Р.С. Козлов, О.В. Сивая, О.И. Кречикова, Н.В. Иванчик// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2010.- № 12.- С. 1-13.
22. Козлов, Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль/ Р.С. Козлов// Клиническая микробиология и антимикробная химио-терапия.- 2000.- Т. 2.- № 1.- С. 16-30.
23. Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии/ В. Л. Миронов. – Н. Новгород, 2004. - 114 с.
24. Окороченков, С.А. Антимикробные пептиды: механизмы действия и перспективы практического применения/ С.А. Окороченков, Г.А. Желтухина, В.Е. Небольсин// Биомедицинская химия.- 2012.- Т. 58.- № 2.- С. 131-143.

25. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова.- Смоленск: МАКМАХ, 2007.- 464 с.
26. Рациональная антимикробная терапия: руководство для практикующих врачей/ Под ред. С.В. Яковлева. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Литтерра, 2015. - 1040 с.
27. Решедько, Г.К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, О.И. Кречикова, М.В. Сухорукова [и др.]// Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.- 2008.- Т. 10.- № 2.- С. 163-179.
28. Савинова, Т. А. Динамика распространения резистентности к бета-лактамам среди *Streptococcus pneumoniae* и ее клиническая значимость/ Т.А. Савинова, С.В. Сидоренко, С.В. Буданов, С.А. Грудинина// Антибиотики и химиотерапия.- 2010.- Т. 55.- №1-2.- С. 12-20.
29. Семин, Н.А. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (методические указания МУК 4.2.1890-04)/ Н.А. Семин, С.В. Сидоренко, С.П. Резван, С.А. Грудинина [и др.]// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.- 2004.- № 4.- С. 306-357.
30. Суковатых, Б.С., Эффективность иммобилизированной формы хлоргексидина в лечении гнойных ран/ Б.С. Суковатых, А.Ю. Григорьян, А.И. Бежин, Т.А. Панкрушева [и др.]// Новости хирургии.- 2015.- Т. 23.- № 2.- С. 138-144.
31. Умнякова, Е.С. Дефенсины как регуляторы системы комплемента/ Е.С. Умнякова, М.Н. Берлов, В.Н. Кокряков// Российский иммунологический журнал.- 2014.- Т. 8 (17).- № 3.- С. 414-417.

32. Федосеев, А.В. Особенности микробного пейзажа раневой поверхности у больных с синдромом диабетической стопы/ А.В. Федосеев, Р.В. Сифоров, А.С. Инютин, А.А. Чекушин [и др.]// Антибиотики и химиотерапия.- 2016.- Т. 61.- № 5-6.- С. 21-24.
33. Плескова, С. Н. Нанотехнологическая АСМ-морфометрия бактериальных клеток. Физика твёрдого тела/ С.Н. Плескова, Е.В. Дубровин, И.С. Голубева, Е.Н. Горшкова [и др.]// Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского.- 2013.- № 2 (2).- С. 34-38.
34. Чалый, Ю.В. Изучение закономерностей индукции синтеза ИЛ-8 под действием нейтрофильных дефензинов *in vitro*/ Ю.В. Чалый, К.В. Котлинский, А.М. Шолух, Н.Н. Войтенко// Медицинская иммунология.- 2005.- Т. 7.- №5-6.- С. 579-582.
35. Шкурников, М.Ю. Роль пептидогликан-распознающих белков в механизмах врожденного иммунитета/ М.Ю. Шкурников, В.В. Степанова, И.Н. Нечаев, Н.А. Хаустова [и др.]// Биотехнология.- 2013.- Т. 29.- № 1.- С. 26-32.
36. Щетинин, Е. В. Многолетний опыт мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний респираторного тракта внебольничной этиологии/ Е.В. Щетинин, В.А. Батурич, М.В. Батурина// Мед. вест. Северного Кавказа.- 2012.- Т. 27.- № 3.- С. 72-74.
37. Яминский, И. В. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих *rfb-a3,4* ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии/ И. В. Яминский, В.В. Демин, В.М. Бондаренко// Журн. микробиологии.- 1997.- № 6.- С. 15-18.
38. Abraham, EP An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin / EP Abraham, E. Chain// Nature.- 1940.- Vol. 146.- Is. 3713.- P. 837-837.

39. Afshar, M. Innate immune defense system of the skin/ M. Afshar, RL Gallo// *Vet Dermatol.*- 2013.- Vol. 24.- Is. 1.- P. 32-38.
40. Alavi, A. Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention/ A. Alavi, RG Sibbald, D. Mayer, L. Goodman [et al.]// *J Am Acad Dermatol.* – 2014.- Vol. 70.- Is. 1.- P. 1.e1-1.e18.
41. Apelqvist, J. Diabetic foot ulcers in a multidisciplinary setting An economic analysis of primary healing and healing with amputation/ J. Apelqvist, G. Ragnarson-Tennvall, J. Larsson, U. Persson// *J Intern Med.*- 1994.- Vol. 235.- Is. 5.- P. 463-471.
42. Németh, BC Relevance of α -defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes/ BC Németh, T. Várkonyi, F. Somogyvári, C. Lengyel [et al.]// *World J Gastroenterol.*- 2014.- Vol. 20.- Is. 27.- P. 9128-9137.
43. Bangert, C. Immune functions of the skin/ C. Bangert, PM Brunner, G. Stingl// *Clin Dermatol.*- 2011.- Vol. 29.- Is. 4.- P. 360-376.
44. Baroud, M. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: Role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases/ M. Baroud, I. Dandache, GF Araj, R. Wakim [et al.]// *Int J Antimicrob Agents.*- 2013.- Vol. 41.- Is. 1.- P. 75-79.
45. Bassetti, M. New antibiotics for bad bugs: where are we?/ M. Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, A. Astilean// *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*- 2013.- Vol. 12.- Is. 1.- P. 22.
46. Binnig, G. Atomic Force Microscope / G. Binnig, CF Quate// *Phys Rev Lett.*- 1986.- Vol. 56.- Is. 9.- P. 930-933.
47. Björn, C. Efficacy and safety profile of the novel antimicrobial peptide PXL150 in a mouse model of infected burn wounds / C. Björn, L. Noppa, E. Näslund

- Salomonsson, AL Johansson [et al.]// *J Int J Antimicrob Agents*.- 2015.- Vol. 45.- Is. 5.- P. 519-524.
- 48.Blair, JMA Molecular mechanisms of antibiotic resistance/ JMA Blair, MA Webber, AJ Baylay, DO Ogbolu [et al.]// *Nat Rev Microbiol*.- 2014.- Vol. 13.- Is. 1.- P. 42-51.
- 49.Boniotto, M. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells/ M. Boniotto, WJ Jordan, J. Eskdale, A. Tossi [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother*.- 2006.- Vol. 50.- Is. 4.- P. 1433-1441.
- 50.Boto, L. Ecological and temporal constraints in the evolution of bacterial genomes/ L. Boto, JL Martínez// *Genes*.- 2011.- Vol. 2.- Is. 4.- P. 804-828.
- 51.Božić, DD Antibacterial activity of three newly-synthesized chalcones & synergism with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ DD Božić, M. Milenković, B. Ivković, I. Ćirković// *Indian J Med Res*.- 2014.- Vol. 140.- Is. 1.- P. 130-137.
- 52.Cao, W. Human neutrophil peptides and complement factor Bb in pathogenesis of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura/ W. Cao, HP Pham, LA Williams, J. McDaniel [et al.]// *Haematologica*.- 2016.- Vol. 101.- Is. 11.- P. 1319-1326.
- 53.Chaly, Y. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells/ Y. Chaly, E. Paleolog, T. Kolesnikova, I. Tikhonov [et al.]// *Eur Cytokine Netw*.- 2000.- Vol. 11.- Is. 2.- P. 257-266.
- 54.Chamorro, CI The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes/ CI Chamorro, G. Weber, A. Grönberg, A. Pivarcsi [et al.]// *J Invest Dermatol*.- 2009.- Vol. 129.- Is. 4.- P. 937-944.

- 55.Chan, DI Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action/ DI Chan, EJ Prenner, HJ Vogel// *Biochim Biophys Acta.*- 2006.- Vol. 1758.- Is. 9.- P. 1184-1202.
- 56.Chantelau, E. Antibiotic treatment for uncomplicated neuropathic forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial/ E. Chantelau, T. Tanudjaja, F. Altenhöfer, Z. Ersanli [et al.]// *Diabet Med.*- 1996.- Vol. 13.- Is. 2.- P. 156-159.
- 57.Cole, AM Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1/ A M Cole, T. Hong, L. M. Boo, T. Nguyen [et al.]// *Proc Natl Acad Sci.*- 2002.- Vol. 99.- Is. 4.- P. 1813-1818.
- 58.Conlon, JM Antimicrobial peptides in frog skin secretions/ JM Conlon, A. Sonnevend// *Methods Mol Biol.*- 2010.- Vol. 618.- P. 3-14.
- 59.Daher, KA Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins/ KA Daher, ME Selsted, RI Lehrer// *J Virol.*- 1986.- Vol. 60.- Is. 3.- P. 1068-1074.
- 60.Davies, J. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance/ J. Davies, D. Davies// *Microbiol Mol Biol Rev.*- 2010.- Vol. 74.- Is. 3.- P. 417-433.
- 61.Dawson, RM Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents/ RM Dawson, CQ Liu// *Crit Rev Microbiol.*- 2008.- Vol. 34.- Is. 2.- P. 89-107.
- 62.Deshpande, LM Occurrence and Characterization of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000–2004)/ LM Deshpande, RN Jones, TR Fritsche, HS Sader// *Microb Drug Resist.*- 2006.- Vol. 12.- Is. 4.- P. 223-230.
- 63.Di Nardo, A. Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A Streptococcus infection of the skin/ A. Di Nardo, K. Yamasaki, RA Dorschner, Y. Lai [et al.]// *J Immunol.*- 2008.- Vol. 180.- Is. 11.- P. 7565-7573.

64. Dong, H. Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections/ H. Dong, Y. Lv, D. Zhao, P. Barrow [et al.]// *J Immunol Res.*- 2016.- doi: 10.1155/2016/751587.
65. Doss, M. Interactions of alpha-, beta-, and theta-defensins with influenza A virus and surfactant protein D/ M. Doss, MR White, T. Tecele, D. Gantz [et al.]// *J Immunol.*- 2009.- Vol. 182.- Is. 12.- P. 7878-7887.
66. Dumville, JC Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes/ JC Dumville, BA Lipsky, C. Hoey, M. Cruciani// *Cochrane Database of Systematic Reviews.*- 2017.- doi: 10.1002/14651858.CD011038.pub2.
67. Edgerton, M. Salivary histatin 5 and human neutrophil defensin 1 kill *Candida albicans* via shared pathways/ M. Edgerton, SE Koshlukova, MWB Araujo, RC Patel [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.*- 2000.- Vol. 44.- Is. 12.- P. 3310-3316.
68. Erbersdobler, H. Maillard reaction products: uptake, metabolic transit and selected parameters of biopotency and safety/ H. Erbersdobler, V. Faist// *Forum of Nutrition 56: Modern Aspects of Nutrition. Present Knowledge and Future Perspectives.*- 2003.- Vol. 56.- P. 353-355.
69. Eskelinen, E. Lower limb amputations in Southern Finland in 2000 and trends up to 2001/ E. Eskelinen, M. Lepäntalo, EM Hietala, H. Sell [et al.]// *Eur J Vasc Endovasc Surg.*- 2004.- Vol. 27.- Is. 2.- P. 193-200.
70. Eslami, MH The adverse effects of race, insurance status, and low income on the rate of amputation in patients presenting with lower extremity ischemia/ MH Eslami, M. Zayaruzny, GA Fitzgerald// *J Vasc Surg.*- 2007.- Vol. 45.- Is. 1.- P. 55-59.
71. Fair, RJ Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century/ RJ Fair, Y. Tor// *Perspect Medicin Chem.*- 2014.- Vol. 6.- Is. 6.- P. 25-64.

72. Findlay, F. Cationic host defense peptides; novel antimicrobial therapeutics against Category A pathogens and emerging infections/ F. Findlay, L. Proudfoot, C. Stevens, PG Barlow// *Pathog Glob Health*.- 2016.- Vol. 110.- Is. 4.- P. 137-147.
73. Fischbach, MA Antibiotics for Emerging Pathogens/ MA Fischbach, CT Walsh// *Science*.- 2009.- Vol. 325.- Is. 5944.- P. 1089-1093.
74. Fleming, A. Further Observations on a Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions/ A. Fleming// *Proc R Soc B Biol Sci*.- 1922.- Vol. 94.- Is. 658.- P. 142-151.
75. Floyd, JL LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*/ JL Floyd, KP Smith, SH Kumar, JT Floyd [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother*.- 2010.- Vol. 54.- Is. 12.- P. 5406-5412.
76. Frieden, T. Antibiotic resistance threats in the United States/ T. Frieden.- *Centers Dis Control Prev*.- 2013.- 114p.
77. Funderburg, N. Human beta-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2/ N. Funderburg, MM Lederman, Z. Feng, MG Drage [et al.]// *Proc Natl Acad Sci*.- 2007.- Vol. 104.- Is. 47.- P. 18631-18635.
78. Furci, L. New role for human α -defensin 5 in the fight against hypervirulent *Clostridium difficile* strains/ L. Furci, R. Baldan, V. Bianchini, A. Trovato [et al.]// *Infect Immun*.- 2015.- Vol. 83.- Is. 3.- P. 986-995.
79. Gabay, JE Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin/ JE Gabay, RP Almeida// *Curr Opin Immunol*.- 1993.- Vol. 5.- Is. 1.- P. 97-102.
80. Ganz, T. Defensins/ T. Ganz, R. Lehrer// *Curr Opin Immunol*.- 1994.- Vol. 6.- Is. 4.- P. 584-589.

81. Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity/ T. Ganz// *Nat Rev Immunol.*- 2003.- Vol. 3.- Is. 9.- P. 710-720.
82. Ghotaslou, R. Classification, microbiology and treatment of diabetic foot infections/ R. Ghotaslou, MY Memar, N. Alizadeh// *Journal of Wound Care.*- 2018.- Vol. 27.- Is. 7.- P. 434-441.
83. Grigat, J. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family/ J. Grigat, A. Soruri, U. Forssmann, J. Riggert [et al.]// *J Immunol.*- 2007.- Vol. 179.- Is. 6.- P. 3958-3965.
84. Grönberg, A. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial/ A. Grönberg, M. Mahlapuu, M. Stähle, C. Whately-Smith// *Wound Repair and Regeneration.*- 2014.- Vol. 22.- Is. 5.- P. 613-621.
85. Haldar, J. Isolation of bacteria from diabetic foot ulcers with special reference to anaerobe isolation by simple two-step combustion technique in candle jar/ J. Haldar, P. Mukherjee, S. Mukhopadhyay, PK Maiti// *Indian J of Medical Research.*- 2017.- Vol. 145.- Is. 1.- P. 97-101.
86. Hall-Stoodley, L. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections/ L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, S. Kathju, N. Høiby [et al.]// *FEMS Immunol Med Microbiol.*- 2012.- Vol. 65.- Is. 2.- P. 127-145.
87. Harder, J. Differential gene induction of human β -defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid/ J. Harder, U. Meyer-Hoffert, K. Wehkamp, L. Schwichtenberg [et al.]// *J Invest Dermatol.*- 2004.- Vol. 123.- Is. 3.- P. 522-529.
88. Hertz, CJ Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2/ CJ Hertz, Q. Wu,

- EM Porter, YJ Zhang [et al.]// J Immunol.- 2003.-Vol. 171.- Is. 12.- P. 6820-6826.
- 89.Hirsch, JG Phagocytin: a bacterial substance from polymorphonuclear leucocytes/ JG Hirsch// J Exp Med.- 1956.- Vol. 103.- Is. 5.- P. 589-611.
- 90.Hirschl, M. Bacterial flora in mal perforant and antimicrobial treatment with ceftriaxone/ M. Hirschl, AM Hirschl// Chemotherapy.- 1992.- Vol. 8.- Is. 4.- P. 275-280.
- 91.Høiby, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms/ N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin [et al.]// Int J Antimicrob Agents.- 2010.- Vol. 35.- Is. 4.- P. 322-332.
- 92.Høiby, N. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014/ N. Høiby, T. Bjarnsholt, C. Moser, GL Bassi [et al.]// Clin Microbiol Infect.- 2015.- Vol. 21.- Suppl 1.- 25p.
- 93.Hooven, TA Retrocyclin inhibits Gardnerella vaginalis biofilm formation and toxin activity/ TA Hooven, TM Randis, SR Hymes, R. Rampersaud [et al.]// J Antimicrob Chemother.- 2012.- Vol. 67.- Is. 12.- P. 2870-2872.
- 94.Hu, RM An Inducible Fusaric Acid Tripartite Efflux Pump Contributes to the Fusaric Acid Resistance in Stenotrophomonas maltophilia/ RM Hu, ST Liao, CC Huang, YW Huang [et al.]// PLoS One.- 2012.- Vol. 7.- Is. 12.- doi.org/10.1371/journal.pone.0051053.
- 95.Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system/ A. Iwasaki, R. Medzhitov// Nat Immunol.- 2015.- Vol. 16.- Is. 4.- P. 343-353.
- 96.Jacobsen, F. Antimicrobial activity of the recombinant designer host defence peptide P-novispirin G10 in infected full-thickness wounds of porcine skin/ F. Jacobsen, A. Mohammadi-Tabrisi, T. Hirsch, D. Mittler [et al.]// J Antimicrob Chemother.- 2007.- Vol. 59.- Is. 3.- P. 493-498.

97. Kalita, A. Role of human neutrophil peptide-1 as a possible adjunct to antituberculosis chemotherapy/ A. Kalita, I. Verma, GK Khuller// *J Infect Dis.*- 2004.- Vol. 190.- Is. 8.- P. 1476-1480.
98. Kaltsa, G. Systemic levels of human β -defensin 1 are elevated in patients with cirrhosis/ G. Kaltsa, G. Bamias, SI Siakavellas, D. Goukos [et al.]// *Annals of Gastroenterology.*- 2016.- Vol. 29.- Is. 1.- P. 63-70.
99. Katayama, Y. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*/ Y. Katayama, T. Ito, K. Hiramatsu// *Antimicrob Agents Chemother.*- 2000.- Vol. 44.- Is. 6.- P. 1549-1555.
100. Kilpeläinen, M. In vivo delivery of a peptide, ghrelin antagonist, with mesoporous silicon microparticles/ M. Kilpeläinen, J. Riikonen, M. Vlasova, A. Huotari [et al.]// *Journal of Controlled Release.*- 2009.- Vol. 137.- Is. 2.- P. 166-1670.
101. Kim, C. Human alpha-defensins neutralize anthrax lethal toxin and protect against its fatal consequences/ C. Kim, N. Gajendran, H-W Mittrücker, M. Weiwadv [et al.]// *Proc Natl Acad Sci.*- 2005.- Vol. 102.- Is. 13.- P. 4830-4835.
102. Kim, C. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: Key role of the stringent stress response/ C. Kim, M. Mwangi, M. Chung, C. Milheirco [et al.]// *PLoS One.*- 2013.- Vol. 8.- Is. 12.- P. e82814.
103. Kim, DJ Efficacy of the designer antimicrobial peptide SHAP1 in wound healing and wound infection/ DJ Kim, YW Lee, MK Park, JR Shin [et al.] // *Amino Acids.*- 2014.- Vol. 46.- Is. 10.- P. 2333-2343.
104. Kirby, A. The lysozyme mechanism sorted – after 50 years/ A. Kirby// *Nat Struct Biol.* - 2001.- Vol. 8.- Is. 9.- P. 737-739.
105. Klotman, ME Defensins in innate antiviral immunity/ ME Klotman, TL Chang// *Nat Rev Immunol.*- 2006.- Vol. 6.- Is. 6.- P. 447-456.

106. Kojima, S. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels/ S. Kojima, H. Nikaido// *Proc Natl Acad Sci.*- 2013.- Vol. 110.- Is. 28.- P. 2629-2634.
107. Koppen, BC Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*/ BC Koppen, Patrick PG Mulder, L. Boer, M. Riool [et al.]// *Int J Antimicrob Agents.*- 2019.- Vol. 53.- Is. 2.- P. 143-151.
108. Kraemer, BF Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation/ BF Kraemer, RA Campbell, H. Schwertz, MJ Cody [et al.]// *PLoS Pathog.*- 2011.- Vol. 7.- Is. 11.- doi.org/10.1371/journal.ppat.1002355.
109. Krishnakumari, V. Antifungal activities of human beta-defensins HBD-1 to HBD-3 and their C-terminal analogs Phd1 to Phd3/ V. Krishnakumari, N. Rangaraj, R. Nagaraj// *Antimicrob Agents Chemother.*- 2009.- Vol. 53.- Is. 1.- P. 256-260.
110. Kumarasamy, KK Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study/ KK Kumarasamy, MA Toleman, TR Walsh, J. Bagaria [et al.]// *Lancet Infect Dis.*- 2010.- Vol. 10.- Is. 9.- P. 597-602.
111. Lan, CCE High-glucose environment reduces human β -defensin-2 expression in human keratinocytes: Implications for poor diabetic wound healing/ CCE Lan, CS Wu, SM Huang, HY Kuo [et al.]// *Br J Dermatol.*- 2012.- Vol. 166.- Is. 6.- P. 1221-1229.
112. Lavery, LA Preventing diabetic foot ulcer recurrence in high-risk patients: Use of temperature monitoring as a self-assessment tool/ LA Lavery, KR Higgins, DR Lanctot, GP Constantinides [et al.]// *Diabetes Care.*- 2007.- Vol. 30.- Is. 1.- P. 14-20.

113. Lavigne, JP An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: Regulation of porin balance in clinical isolates/ JP Lavigne, A. Sotto, MH Nicolas-Chanoine, N. Bouziges [et al.]// *Int J Antimicrob Agents*.- 2013.- Vol. 41.- Is. 2.- P. 130-136.
114. Lebeaux, D. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections/ D. Lebeaux, A. Chauhan, O. Rendueles, C. Beloin// *Pathogens*.- 2013.- Vol. 2.- Is. 2.- P. 288-356.
115. Lebrun, E. The role of surgical debridement in healing of diabetic foot ulcers/ E. Lebrun, M. Tomic-Canic, RS Kirsner// *Wound Repair Regen*.- 2010.- Vol. 18.- Is. 5.- P. 433-438.
116. Lee, SY Antimicrobial management of complicated skin and skin structure infections in the era of emerging resistance/ SY Lee, JL Kuti, DP Nicolau // *Surg Infect (Larchmt)*.- 2005.- Vol. 6.- Is. 3.- P. 283-295.
117. De Leeuw, E. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II/ E. De Leeuw, C. Li, P. Zeng, C. Li [et al.]// *FEBS Lett*.- 2010.- Vol. 584.- Is. 8.- P. 1543-1548.
118. LeFrock, JL Mechanism of action, antimicrobial activity, pharmacology, adverse effects, and clinical efficacy of cefotaxime/ JL LeFrock, RA Prince, RD Leff// *Pharmacotherapy*.- 1982.- Vol. 2.- Is. 4.- P. 174-184.
119. Leikina, E. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins/ E. Leikina, H. Delanoë-Ayari, K. Melikov, M-S Cho [et al.]// *Nat Immunol*.- 2005.- Vol. 6.- Is. 10.- P. 995-1001.
120. Leverstein-van Hall MA Consequences of switching from a fixed 2:1 ratio of amoxicillin/clavulanate (CLSI) to a fixed concentration of clavulanate (EUCAST) for susceptibility testing of *Escherichia coli*/ MA Leverstein-van Hall, K. Waar, J. Muilwijk, JC Stuart [et al.]// *J Antimicrob Chemother*.- 2013.- Vol. 68.- Is. 11.- P. 2636-2640.

121. Levings, PP The human beta-globin locus control region/ PP Levings, J. Bungert//*Eur J Biochem.*- 2002.- Vol. 269.- P. 1589-1599.
122. Liberman, A. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine/ A. Liberman, N. Mendez, WC Trogler, AC Kummel// *Surface science reports.*- 2014.- Vol. 69.- Is. 2-3.- P. 132-158.
123. Lipsky, BA Medical treatment of diabetic foot infections/ BA Lipsky// *Clin Infect Dis.*- 2004.- Vol. 39.- Suppl 2.- P.104-114.
124. Lu, W. Pro-inflammatory and pro-apoptotic properties of Human Defensin 5/ W. Lu, E. De Leeuw// *Biochem Biophys Res Commun.*- 2013.- Vol. 436.- Is. 3.- P. 557-562.
125. Maiti, S. Effective control of salmonella infections by employing combinations of recombinant antimicrobial human β -Defensins hBD-1 and hBD-2/ S. Maiti, S. Patro, S. Purohit, S. Jain [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.*- 2014.- Vol. 58.- Is. 11.- P. 6896-6903.
126. Martinez, JL A global view of antibiotic resistance/ JL Martinez, A. Fajardo, L. Garmendia, A. Hernandez [et al.]// *FEMS Microbiol Rev.*- 2009.- Vol. 33.- Is. 1.- P. 44-65.
127. Martinez, JL General principles of antibiotic resistance in bacteria/ JL Martinez// *Drug Discov Today Technol.*- 2014.- Vol. 11.- Is. 1.- P. 33-39.
128. Martinez, JL Mutation frequencies and antibiotic resistance/ JL Martinez, F. Baquero// *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*- 2000.- Vol. 44.- Is. 7.- P. 1771-1777.
129. Matuschek, E. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories/ E. Matuschek, DFJ Brown, G. Kahlmeter// *Clin Microbiol Infect.*- 2014.- doi:10.1111/1469-0691.12373.

130. Matsuzaki, K. A comparative study on interactions of α -aminoisobutyric acid containing antibiotic peptides, trichopolyn I and hypelcin A with phosphatidylcholine bilayers/ K. Matsuzaki, T. Shioyama, E. Okamura, J. Umemura [et al.]// *Biochim Biophys Acta.*- 1991.- Vol. 1070.- Is. 2.- P. 419-428.
131. Matter, EH Elevated concentrations of defensins in Hepatitis C virus-infected patients/ EH Matter, HA Almehdar, AA Aljaddawi, IEM Abu Zeid [et al.]// *J Immunol Res.*- 2016.- doi.org/10.1155/2015/8373819.
132. Mayanskiy, N. Serotypes and antibiotic resistance of noninvasive *Streptococcus pneumoniae* circulating in pediatric hospitals in Moscow, Russia/ N. Mayanskiy, N. Alyabieva, O. Ponomarenko, A. Lazareva [et al.]// *Int J Infect Dis.*- 2014.- Vol. 20.- P. 58-62.
133. McConkey, B. The performance of current methods in ligand-protein docking/ BJ McConkey, V. Sobolev, M. Edelman// *Current Science.*- 2002.- Vol. 83.- P. 845-855.
134. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.- CLSI, 2015.- 87c.
135. Mohamed, MF Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*/ MF Mohamed, A. Abdelkhalek, MN Seleem/ *Sci Rep.*- 2016.- doi:10.1038/srep29707.
136. Mor, A. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity/ A. Mor, P. Nicolas// *J Biol Chem.* - 1994.- Vol. 269.- Is. 3.- P. 1934-1939.
137. Mowat, AG Chemotaxis of Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Diabetes Mellitus / AG Mowat, J. Baum// *N Engl J Med.*- 1971.- Vol. 284.- Is. 12.- P. 621-627.

138. Myhrman, E. The novel antimicrobial peptide PXL150 in the local treatment of skin and soft tissue infections/ E. Myhrman, J. Håkansson, K. Lindgren, C. Björn [et al.]// *Appl Microbiol Biotechnol.*- 2013.- Vol. 97.- Is. 7.- P. 3085-3096.
139. Nagaoka, I. An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7/ I. Nagaoka, H. Tamura, M. Hirata// *J Immunol.*- 2006.- Vol. 176.- Is. 5.- P. 3044-3052.
140. Nikiyan, H. Humidity-Dependent Bacterial Cells Functional Morphometry Investigations Using Atomic Force Microscope/ H. Nikiyan, A. Vasilchenko, D. Deryabin// *Int J Microbiol.*- 2010.- doi:10.1155/2010/704170.
141. Norris, AL Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa/ AL Norris, EH Serpersu// *Protein Sci.*- 2013.- Vol. 22.- Is. 7.- P. 916-928.
142. Nussbaum, SR An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds/ SR Nussbaum, MJ Carter, CE Fife, J. DaVanzo [et al.]// *Value Heal.* - 2017.- Vol. 21.- Is. 1.- P. 27-32.
143. Ogawa, W. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*/ W. Ogawa, M. Onishi, R. Ni, T. Tsuchiya [et al.]// *Gene.*- 2012.- Vol. 498.- Is. 2.- P. 177-182.
144. O'Neill, J. Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a Global Health Crisis: Rapid Diagnostics: Stopping Unnecessary Use of Antibiotics/ J. O'Neill.- *Indep Rev AMR.*- 2015.- 36c.
145. Oren, Z. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides/ Z. Oren, Y. Shai// *Biopolymers.*- 1998.- Vol. 47.- Is. 6.- P. 451-463.
146. Orhan, G. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*/ G. Orhan, A. Bayram, Y. Zer, I. Balci// *J Clin Microbiol.*- 2005.- Vol. 43.- Is. 1.- P. 140-143.

147. Pachón-Ibáñez, ME Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides/ ME Pachón-Ibáñez, Y. Smani, J. Pachón, J. Sánchez-Céspedes// *FEMS Microbiol Rev.*- 2017.- Vol. 41.- Is. 3.- P. 323-342.
148. Panyutich, A. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis/ A. Panyutich, E. Panyutich, V. Krapivin, E. Baturevich [et al.]// *J Lab Clin Med.*- 1993.- Vol. 122.- Is. 2.- P. 202-207.
149. Park, TH Management of diabetic foot: Brief synopsis for busy orthopedist / TH Park, A. Anand// *J Clin Orthop trauma.*- 2015.- Vol. 6.- Is. 1.- P. 24-29.
150. Pasare, C. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity/ C. Pasare, R. Medzhitov // *Microbes Infect.*- 2004.- Vol. 6.- Is. 15.- P. 1382-1387.
151. Percival, SL A review of the scientific evidence for biofilms in wounds/ SL Percival, KE Hill, DW Williams, SJ Hooper [et al.]// *Wound Repair Regen.*- 2012.- Vol. 20.- Is. 5.- P. 647-657.
152. Petrik, P. Methods for optical modeling and cross-checking in ellipsometry and scatterometry Proceedings of SPIE/ P. Petrik, B. Fodor, E. Agocs, P. Kozma [et al.]// *Proceeding of SPIE - The International Society for Optical Engineering.*- 2015.- doi:10.1117/12.2184833.
153. Pfalzgraff, A. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds/ A. Pfalzgraff, K. Brandenburg, G. Weindl// *Front Pharmacol.*- 2018.- doi:10.3389/fphar.2018.00281.
154. Pfaller, MA Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values/ MA Pfaller, A. Espinel-Ingroff, L. Boyken, RJ Hollis [et al.]// *J Clin Microbiol.*- 2011.- Vol. 49.- Is. 3.- P. 845-850.

155. Poirel, L. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods/ L. Poirel, RA Bonnin, P. Nordmann// *Infect Genet Evol.*- 2012.- Vol. 12.- Is. 5.- P. 883-893.
156. Porter, E. Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions/ E. Porter, H. Yang, S. Yavagal, GC Preza [et al.]// *Infect Immun.*- 2005.- Vol. 73.- Is. 8.- P. 4823-4833.
157. Portou, MJ The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review/ MJ Portou, D. Baker, D. Abraham, J. Tsui// *Vascul Pharmacol.*- 2015.- Vol. 71.- P. 31-36.
158. Teo, SW Preliminary investigations into developing all-D Omiganan for treating Mupirocin-resistant MRSA skin infections/ SW Teo, YE Yong, FM Ng, QY Lau [et al.]// *Chem Biol Drug Des.*- 2017.- Vol. 90.- Is. 6.- P. 1155-1160.
159. Presicce, P. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91/ P. Presicce, S. Giannelli, A. Taddeo, ML Villa [et al.]// *Journal of leukocyte biology.*- 2009.- Vol. 86.- Is. 4.- P. 941-948.
160. Qin, S. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*/ S. Qin, Y. Wang, Q. Zhang, X. Chen [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.*- 2012.- Vol. 56.- Is. 10.- P. 5332-5339.
161. Rivas-Santiago, B. Expression of antimicrobial peptides in diabetic foot ulcer/ B. Rivas-Santiago, V. Trujillo, A. Montoya, I. Gonzalez-Curiel [et al.]// *Dermatol Sci.*- 2012.- Vol. 65.- Is. 1.- P. 19-26.
162. Rodríguez-García, M. Increased α -defensins 1-3 production by dendritic cells in HIV-infected individuals is associated with slower disease progression/

- M. Rodríguez-García, N. Climent, H. Oliva, V. Casanova [et al.]// PLoS One.- 2010.- Vol. 5.- Is. 2.- P. 8-10.
163. Rohrl, J. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2/ J. Rohrl, D. Yang, JJ Oppenheim, T. Hehlhans// J. Immunol.- 2010.- Vol. 184.- Is. 12.- P. 6688-6694.
164. Rolain, J-M Do we need new antibiotics?/ J-M Rolain, C. Abat, M-T Jimeno, P-E Fournier [et al.]// Clin Microbiol Infect.- 2016.- Vol. 22.- Is. 5.- P. 408-415.
165. Rossolini, GM The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases/ GM Rossolini, MM D'Andrea, C. Mugnaioli// Clinical Microbiology and Infection.- 2008.- Vol. 14.- Suppl. 1.- P. 33-41.
166. Roupé, KM Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing/ KM Roupé, M. Nybo, U. Sjöbring, P. Alberius [et al.]// J Invest Dermatol.- 2010.- Vol. 130.- Is. 4.- P. 1167-1177.
167. Ruden, S. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides/ S. Ruden, K. Hilpert, M. Berditsch, P. Wadhvani [et al.]// Antimicrob Agents Chemother.- 2009.- Vol. 53.- Is. 8.- P. 3538-3540.
168. Ryu, S. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides/ S. Ryu, PI Song, CH Seo, H. [et al.]// Int J Mol Sci.- 2014.- Vol. 15.- Is. 5.- P. 8753-8772.
169. Schroeder, BO Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1/ BO. Schroeder, Z. Wu, S. Nuding, S. Groscurth [et al.]// Nature.- 2011.- Vol. 469.- Is. 7330.- P. 419-423.
170. Seidel, A. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms/ A. Seidel, Y. Ye, LR de Armas, M. Soto [et al.]// PLoS One.- 2010.- Vol. 5.- Is 3.- P. e9737.

171. Selsted, ME Mammalian defensins in the antimicrobial immune response/ ME Selsted, AJ Ouellette// *Nat Immunol.*- 2005.- Vol. 6.- Is. 6.- P. 551-557.
172. Sengupta, D. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder/ D. Sengupta, H. Leontiadou, AE Mark, SJ Marrink// *Biochim Biophys Acta - Biomembr.*- 2008.- Vol. 1778.- Is. 10.- P. 2308-2317.
173. Silver, LL Challenges of antibacterial discovery/ LL Silver// *Clinical microbiology reviews.*- 2011.- Vol. 24.- Is. 1.- P. 71-109.
174. Snyder, RJ Controversies regarding vascular disease in the patient with diabetes: a review of the literature/ RJ Snyder // *Ostomy Wound Manage.*- 2007.- Vol. 53.- Is. 11.- P. 40-48.
175. Sorensen, OE Differential Regulation of - Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli / OE Sorensen, DR Thapa, A. Rosenthal, L. Liu [et al.]// *J Immunol.*- 2005.- Vol. 174.- Is. 8.- P. 4870-4879.
176. Suarez-Carmona, M. Defensins: “Simple” antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules?/ M. Suarez-Carmona, P. Hubert, P. Delvenne, M. Herfs// *Cytokine Growth Factor Rev.*- 2015.- Vol. 26.- Is. 3.- P. 361-370c.
177. Suarez-Carmona, M. Δ Np63 isoform-mediated β -defensin family up-regulation is associated with (lymph)angiogenesis and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma/ M. Suarez-Carmona, P. Hubert, A. Gonzalez, A. Duray [et al.]// *Oncotarget.*- 2014.- Vol. 5.- Is. 7.- P. 1856-1868.
178. Takahashi, T. The Critical and Multifunctional Roles of Antimicrobial Peptides in Dermatology/ T. Takahashi, RL Gallo// *Dermatol Clin.*- 2017.- Vol. 35.- Is. 1.- P. 39-50.
179. Teo, SW Preliminary investigations into developing all-D Omiganan for treating Mupirocin-resistant MRSA skin infections/ SW Teo, YE Yong, FM Ng, QY Lau [et al.] // *Chem Biol Drug Des.*- 2017.- Vol. 90.- Is. 6.- P. 1155-1160.

180. Thangamani, S. Antibacterial activity and therapeutic efficacy of Fl-P(R)P(R)P(L)-5, a cationic amphiphilic polyproline helix, in a mouse model of staphylococcal skin infection/ S. Thangamani, M. Nepal, J. Chmielewski, MN Seleem// *Drug Des Devel Ther.*- 2015.- Vol. 22.- Is. 9.- P. 5749-5754.
181. Tran, QT The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: Insights from structure-based solvation mapping using WaterMap/ QT Tran, S. Williams, R. Farid, G. Erdemli [et al.]// *Proteins Struct Funct Bioinforma.*- 2013.- Vol. 81.- Is. 2.- P. 291-299.
182. Ueno, H. Dendritic cell subsets in health and disease/ H. Ueno, E. Klechevsky, R. Morita, C. Aspod [et al.]// *Immunol. Rev.*- 2007.- Vol. 219.- P. 118-142.
183. Uçkay, I. Diabetic foot infections: what have we learned in the last 30 years?/ I. Uçkay, J. Aragón-Sánchez, D. Lew, B. A. Lipsky// *Int J Infect Dis.*- 2015.- Vol. 40.- Is. 8.- P. 81-91.
184. Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013// *Diabetes Res Clin Pract.*- 2015.- Vol. 109.- Is. 3.- P. 461-465.
185. Vaschetto, R. Role of human neutrophil peptides in the initial interaction between lung epithelial cells and CD4+ lymphocytes/ R. Vaschetto, J. Grinstein, L. Del Sorbo, A. A. Khine [et al.]// *J Leukoc Biol.*- 2007.- Vol. 81.- Is. 4.- P. 1022-1031.
186. Vetting, MW Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor/ MW Vetting, SS Hegde, M. Wang, GA Jacoby [et al.]// *J Biol Chem.*- 2011.- Vol. 286.- Is. 28.- P. 25265-25273.
187. Wang, G. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education/ G. Wang, X. Li, Z. Wang// *Nucleic Acids Res.*- 2016.- doi.org/10.1093/nar/gkv1278.

188. Wang, G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins/ G. Wang// Pharmaceuticals.- 2014.- Vol. 7.- Is. 5.- P. 545-594.
189. Wang, YS Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice/ YS Wang, D. Li, HS Shi, YJ Wen [et al.]// Clin Cancer Res.- 2009.- Vol. 15.- Is. 22.- P. 6901-6911.
190. Wang, Y. Ordered nanoporous silica as carriers for improved delivery of water insoluble drugs: a comparative study between three dimensional and two dimensional macroporous silica/ Y. Wang, Q. Zhao, Y. Hu, L. Sun [et al.]// Int J of nanomedicine.- 2013.- Vol. 22.- Is. 8.- P. 4015-4031.
191. Watford, WT The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses/ WT Watford, M. Moriguchi, A. Morinobu, JJ O'Shea //Cytokine Growth Factor Rev.- 2003.- Vol. 14.- P. 361-368.
192. Wehkamp, J. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4/ J. Wehkamp, G. Wang, I. Kübler, S. Nuding [et al.]// J. Immunol. - 2007.- Vol. 179.- Is. 5.- P. 3109-3118.
193. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines/ S. Werner, R. Grose// Physiol Rev.- 2003.-Vol. 83.- Is. 3.- P. 835-870.
194. White, RL Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test/ RL White, DS Burgess, M. Manduru, JA Bosso// Antimicrob Agents Chemother.- 1996.- Vol. 40.- Is. 8.- P. 1914-1918.
195. Wilmes, M. Defensin-based anti-infective strategies/ M. Wilmes, H. G. Sahl// Int J Med Microbiol.- 2014.- Vol. 304.- Is. 1.- P. 93-99.
196. Wilson, SS Antiviral mechanisms of human defensins/ SS Wilson, ME Wiens, JG Smith// J Mol Biol.- 2013.- Vol. 425.- Is. 24.- P. 4965-4980.
197. Yamaguchi, Y. Antimicrobial peptide defensin: Identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their

- significance in the pathogenesis of diseases/ Y. Yamaguchi, Y. Ouchi// Proc Japan Acad. Ser. B.- 2012.- Vol. 88.- Is. 4.- P. 152-166.
198. Yang, D. Beta-Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6/ D. Yang, O. Chertov, SN Bykovskaia, Q. Chen [et al.]// Science.- 1999.- Vol. 286.- P. 525-528.
199. Yigit, H. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*/ H. Yigit, AM Queenan, GJ Anderson, A. Domenech-Sanchez [et al.]// Antimicrob Agents Chemother.- 2001.- Vol. 45.- Is. 4.- P. 1151-1161.
200. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms/ M. Zasloff// Nature.- 2002.- Vol. 415.- Is. 6870.- P. 389-395.
201. Zeya, HI Antibacterial and Enzymic Basic Proteins from Leukocyte Lysosomes: Separation and Identification/ HI Zeya, JK Spitznagel// Science.- 1963.- Vol. 142.- Is. 3595.- P. 1085-1087.
202. Zhao, W-H Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria/ W-H Zhao, Z-Q Hu// Crit Rev Microbiol.- 2013.- Vol. 39.- Is. 1.- P. 79-101.
203. Zhao, Y. Accelerated skin wound healing by soy protein isolate–modified hydroxypropyl chitosan composite films/ Zhao, Y, Wang Z, Zhang Q, et al. // Int J Biol Macromol.- 2018.- Vol. 118.- P. 1293-1302.
204. Zhao, X. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides/ X. Zhao, H. Wu, H. Lu, G. Li [et al.]// PLoS One.- 2013.- Vol. 8.- Is. 6.- P. 1-6.
205. Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.- Женева, 2016 [Электронный ресурс].- Режим доступа: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254884/1/9789244509760-rus.pdf?ua=1> (Дата обращения: 20.04.2019).

206. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.- Geneva, 2017 [Электронный ресурс].- Режим доступа: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1%20 (Дата обращения: 20.04.2019).
207. Способ определения скорости заживления раневой поверхности// Патент России №2102755. 1998. / Осинцев Е.Ю., Слободской А.Б.