

Выделение эндогенных антимикробных пептидов и инкапсулирование их в кремнийорганические ниосомы

И.А.Базиков, А.Н.Мальцев, О.И.Седых, В.А.Батуринов, А.Д.Болатчиев, А.А.Ефременко

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет», Ставрополь, Российская Федерация

Разработана методика выделения эндогенных антимикробных пептидов (АМП). В качестве сырья для получения эндогенных АМП использовали лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарную массу крови доноров. Использовали ферментативный гидролиз исходного сырья, пропускание через разделительную колонку с Сефадексом G-25 и последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Выделение АМП проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на разделительной колонке с трехкратным использованием Сефадекса G-25. АМП инкапсулированы в кремнийорганические ниосомы.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, дефензины, ниосомы, антибиотикоустойчивые микроорганизмы

Для цитирования: Базиков И.А., Мальцев А.Н., Седых О.И., Батуринов В.А., Болатчиев А.Д., Ефременко А.А. Выделение эндогенных антимикробных пептидов и инкапсулирование их в кремнийорганические ниосомы. Бактериология. 2019; 4(3): 14–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-14-17

Isolation of endogenous antimicrobial peptides and encapsulation them into organosilicon niosomes

I.A.Bazikov, A.N.Maltsev, O.I.Sedykh, V.A.Baturin, A.D.Bolatchiev, A.A.Efremenko

Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

A technique for isolating of endogenous antimicrobial peptides (AMP) has been developed. Leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass of donors was used as raw material for preparing endogenous AMP. Enzymatic hydrolysis was used, passing through the Sephadex separation column G-25 followed by sterilizing filtration of the obtained substance through fine pore filters having a pore diameter of 0.2 μm . The separation of antimicrobial peptides was carried out by high performance liquid chromatography on the separation column using Sephadex G-25 three times. The AMP are encapsulated in organosilicon niosomes.

Keywords: antimicrobial peptides, defensins, niosomes, antibiotic-resistant microorganisms

For citation: Bazikov I.A., Maltsev A.N., Sedykh O.I., Baturin V.A., Bolatchiev A.D., Efremenko A.A. Isolation of endogenous antimicrobial peptides and encapsulation them into organosilicon niosomes. Bacteriology. 2019; 4(3): 14–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-14-17

В настоящее время в медицине большое внимание уделяется веществам, воздействующим на антибиотикоустойчивую микрофлору. Одной из групп таких веществ являются антимикробные пептиды (АМП) – низкомолекулярные полимеры аминокислот, имеющие катионную или амфипатическую природу. Они синтезируются в организме большинства эукариот в ответ на внедрение чужеродных микроорганизмов. К ним относятся дефензины, которые имеют большие перспективы применения в качестве антимикробных препаратов, так как характеризуются высокой противомикробной активностью, безопасностью и отсутствием

формирования с течением времени резистентности [1, 2]. Известно, что АМП являются одними из ключевых молекул врожденного иммунитета и обеспечивают противомикробную защиту организма. Кроме антимикробного действия, АМП проявляют широкий спектр других биологических эффектов, что дает основание причислить их к биомодуляторным соединениям. АМП участвуют в процессах ранозаживления, способны связывать эндотоксины и проявлять противоопухолевое действие. В этой связи АМП являются перспективными молекулами-прототипами для создания новых лекарственных препаратов. Однако основным их

Для корреспонденции:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310

Телефон: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

Статья поступила 30.08.2019 г., принята к печати 26.09.2019 г.

For correspondence:

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of microbiology of Stavropol State Medical University

Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation

Phone: (8652) 35-2475

E-mail: bazikov@list.ru

The article was received 30.08.2019, accepted for publication 26.09.2019

недостатком является высокая стоимость рекомбинантного синтеза АМП для полномасштабного производства конечного продукта.

Встречающиеся в природе пептиды часто не подходят для использования в качестве терапевтических средств, так как имеют ряд недостатков, включая химическую и физическую нестабильность, а также короткий период полураспада в циркулирующей плазме крови. Некоторые из этих недостатков могут быть успешно устранены с помощью методов традиционной конструкции и ряда других разрабатываемых в настоящее время технологий. Предварительно нами разработаны методики инкапсулирования лекарственных веществ в кремнийорганические ниосомы [3–6].

Ранее нами был получен гель, содержащий рекомбинантные синтетические дефензины HNP-1 и HBD-1, инкапсулированные в кремнийорганические наноконтейнеры [7]. Перспективным является использование комбинации эндогенных АМП и низкомолекулярных регуляторных пептидов, участвующих в процессе регенерации. Так, одним из первых препаратов на основе низкомолекулярных пептидов, разрешенных к применению FDA в США, был Becaplermin (Regranex®; Ortho-McNeil Pharmaceutical, Raritan, США), тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB), способный уменьшать время заживления раны. Аналоги кожи (LSE) – еще один класс усовершенствованных препаратов для лечения ран. В настоящее время два препарата одобрены и применяются для лечения диабетической язвы стопы. Это комплексный трансплантат, содержащий как эпидермальные, так и дермальные компоненты – Apligraf (Organogenesis Inc., США), и трансплантат, содержащий эндогенные белки и цитокины дермальной матрицы – Dermagraft (Organogenesis Inc., США). Для улучшения ангиогенеза эффективен Angipars, Regranex® (Smith & Nephew plc., Великобритания), биоактивный гель, содержащий фактор роста тромбоцитов (PDGF).

Целью нашего исследования явилось изучение возможности выделения эндогенных АМП из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и инкапсулирование их в кремнийорганические ниосомы для дальнейшего изучения антимикробной активности при ранозаживлении, осложненном антибиотикоустойчивыми микроорганизмами.

Материалы и методы

В качестве сырья для получения эндогенных АМП использовали лейкоцитарно-тромбоцитарную массу крови доноров. Отобранная для переработки лейкоцитарно-тромбоцитарная масса проходила вирусологический контроль (на отсутствие HBS-антител к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ), рН ($6,81 \pm 0,23$), содержание аминного азота ($249,90 \pm 36,35$) мг%. Гидролизат получали ферментативным гидролизом с использованием 10 мл стерильного раствора трипсина (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия) на

100 мл гидролизуемой смеси в течение 1 ч в растворе фосфатного буфера рН 7,4. Гидролизат осветляли раствором перекиси водорода с конечной концентрацией 0,6%. Полученный гидролизат пропускали через разделительную колонку, на дне которой находится мелкопористый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и 30 г Сефадекса G-25. Первую фракцию удаляли. Через набухший гель пропускали раствор фосфатного буфера рН 7,4. Отбирали пробу с максимальным содержанием антибактериальных пептидов массой 3–5 кДа. Для определения максимальной концентрации АМП в полученных образцах использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Люмахром» (Россия) при $\lambda = 214$ нм. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер рН 7,4. Скорость подачи подвижной фазы – 150 мм³/мин. Для построения калибровочной кривой использовали стандарт дефензина-альфа 1 из наборов Cloud-Clone Corp. (США) [8, 9].

В дальнейшем инкапсулировали АМП в кремнийорганические ниосомы и получали ниосомальный гель для изучения его антимикробной активности при ранозаживлении диабетических язв, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами. В полученный раствор АМП поэтапно добавляли 100 мл ПЭГ-12 диметикона и 400 мл воды. Получение ниосом и инкапсулирование в АМП проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом перемешивании на шейкере в течение 5–10 мин. Для формирования ниосом более мелких размеров смесь интенсивно перемешивали с использованием гомогенизатора APV (Германия). Для формирования ниосом размерами 80–100 нм ранее полученную дисперсию ниосом с инкапсулированными дефензинами помещали в сосуд для ультразвуковой обработки. Использовали следующий режим озвучивания: частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт; время экспозиции – 15 мин. Для сохранения физико-химических характеристик ниосом использовали 50 мл гелеобразователя Covacryl MV 60 в жидком виде, который образовывал трехмерную объемную «сетку» при добавлении 20 мл триэтаноламина. Общий объем геля доводился до 1000 мл очищенной водой [10, 11].

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлен калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1), где по оси абсцисс указана концентрация АМП, а по оси ординат – площадь пика. Полученную фракцию еще раз стерилизовали фильтрацией через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 2 представлена хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, а по оси ординат – оптическая плотность (mAU). Помимо дефензина альфа, и другие виды дефензинов в остаточном количестве отражены в таблице 1, где пик 1 – фракция дефензина

Таблица 1. Данные в остаточном количестве: пик 1 – фракция дефензина альфа, 2, 3, 4 – фракции других дефензинов

Пик	Время (мин)	Компонент	Концентрация (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	2,52	Дефензин альфа 1	0,038	13,503	288,288	16,907
2	3,27			3,748	74,265	18,617
3	3,82			0,816	26,851	21,490
4	5,61			1,976	30,067	14,199

Таблица 2. Данные хроматограммы после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25

Пик	Время (мин)	Компонент	Концентрация (мкг/мл)	Высота	Площадь	Полуширина
1	0,28			1,249	297,730	17,732
2	2,69	Дефензин альфа 1	0,335	83,363	2574,624	27,460
3	3,32			92,425	1454,809	13,406

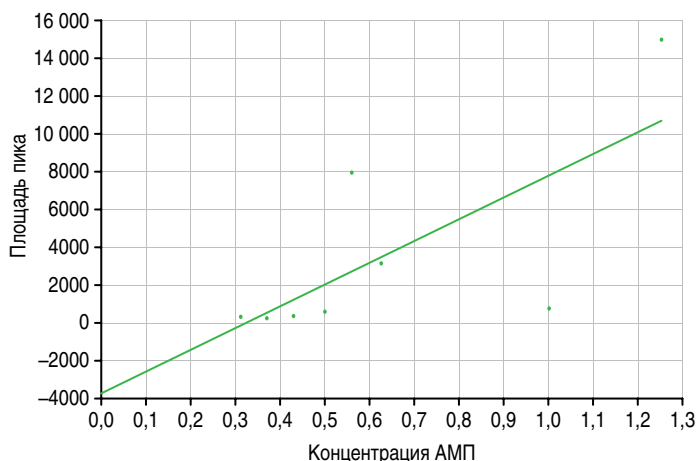


Рис. 1. Калибровочный график концентраций АМП (дефензин-альфа 1).

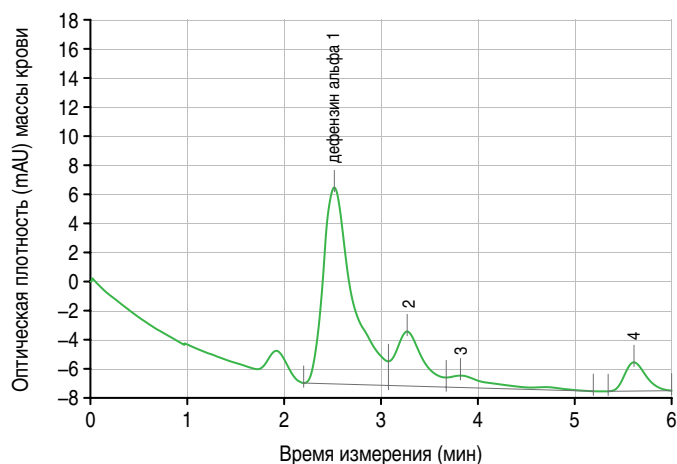


Рис. 2. Хроматограмма фракции АМП, полученная без использования разделительной колонки.

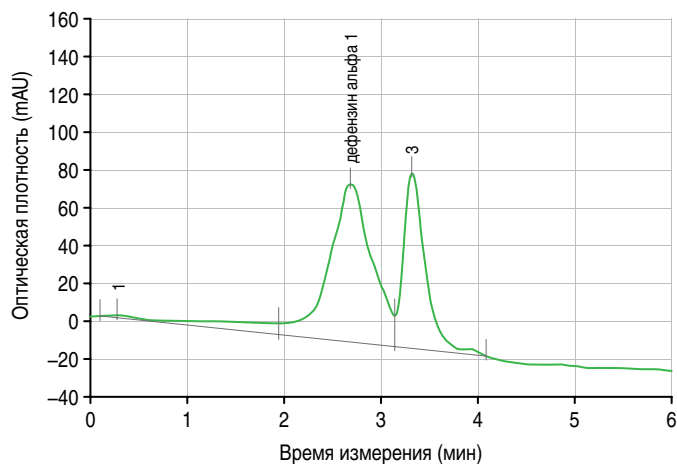


Рис. 3. Хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25.

альфа, а 2, 3, 4 – фракции других дефензинов в остаточном количестве. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 3 представлена хроматограмма фракции АМП после промывки, регенерации и высушивания при использовании разделительной колонки без дополнительной замены Сефадекса G-25. По оси абсцисс указано время измерения в минутах, по оси ординат – оптическая плотность. В таблице 2 отображены данные хроматограммы после промывки.

Из представленных результатов видно, что использование в качестве исходного сырья лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и разделительной колонки с Сефадексом G-25 позволило оптимизировать технологию выделения наиболее полной фракции естественных низкомолекулярных пептидов, содержащих АМП для повышения их биологической ценности и дальнейшего создания фармацевтических композиций.

Способ обеспечивал получение 200 мл фракции, содержащей антимикробные пептиды с концентрацией 0,335 мкг/мл. Применение указанного способа позволяло несколько раз использовать Сефадекс G-25 после промывки, регенерации и высушивания, что в перспективе будет значительно снижать стоимость фармацевтических композиций с содержанием выделенных природных АМП.

Заключение

Таким образом, получен способ выделения природных антимикробных пептидов, содержащий ферментативный гидролиз исходного сырья, пропускание через разделительную колонку с Сефадексом G-25 и последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, отличающийся тем, что в качестве исходного сырья использовали лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарную массу крови доноров, которую предварительно подвергали гемолизу трипсином, а выделение антимикробных пептидов проводили методом жидкостной хроматографии на разделительной колонке с трехкратным использованием Сефадекса G-25. В последующем АМП инкапсулированы в кремнийорганические иносомы по ранее разработанной методике [9, 10, 11].

Литература

- Larijani B, Hasani SR. Overview of diabetic foot; Novel treatments in diabetic foot ulcer. DARU 2008;16 (Suppl. 1):1-6.
- Ashtikar M, Wacke MG. Nanopharmaceuticals for wound healing – Lost in translation? Adv Drug Deliv Rev. 2018 Apr;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
- Базиков ИА, Мальцев АН. Кремнийорганические иносомы с бактерицидными и парамагнитными свойствами. Патент на изобретение RUS 2625722 18.07.2017

4. Базиков ИА, Аксенов АВ, Аксенов НА, Мальцев АН, Смирнов АН. Фармацевтический нисомальный гель на основе вещества п-гидрокси-2-(2-(нафтален-2-ил)-1H-индол-3-ил)-2-фенилацетамид с противоопухолевой активностью к глиобластоме. Патент на изобретение RUS 2627449 04.08.2017
5. Базиков ИА, Аксенов АВ, Мальцев АН, Селимов МА, Корниенко АВ, Аксенов АН, и др. Свойства разработанной нисомальной формы противоопухолевого вещества N-гидроxy-2-(2-(нафthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide для лечения глиобластомы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(2):196-99. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11035
6. Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. Journal of Nanoparticle Research. 2019;21(1):2049.
7. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on Staphylococcus aureus strains in vitro and in vivo. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2019. DOI:10.1111/fcp.12499
8. Мальцев АН, Базиков ИА, Батурин ВА, Ефременко АА, Лысогора ЛВ. Выделение природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови. Сборник материалов VI Всероссийской научной-практической конференции с международным участием. М., 29 ноября 2019 г., с. 138.
9. Болатчиев АД, Батурин ВА, Базиков ИА. Антимикробный гель для лечения инфицированных ран, ожогов и трофических язв. Патент на изобретение RUS 2655522 от 28.05.2018
10. Базиков ИА, Мальцев АН, Седых ОИ, Болатчиев АД. Разработка нисомального лекарственного геля с альфа- дефензином hnp-1. В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4-й международной научно-практической конференции. Ставрополь, 2018, с. 87-89.
11. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2018;13(3):515-7. DOI: 10.14300/mnnc.2018.13093
8. Maltsev AN, Bazikov IA, Baturin VA, Efremenko AA, Lysohora LV. Isolation of natural antimicrobial peptides from leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass. Proceedings of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation. Moscow, 29 Nov 2019, p. 138. (In Russian).
9. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA. Antimicrobial gel for treatment of infected wounds, burns and trophic ulcers. Patent for the invention RUS 2655522 dated 28.05.2018. (In Russian).
10. Bazikov IA, Maltsev AN, Sedykh OI, Bolatchiev AD. Development of niosomal drug gel with alpha- defensin hnp-1. In: Biotechnology: a look to the future. Proceedings of the 4th International Scientific and Practical Conference. Stavropol, 2018, pp. 87-89. (In Russian).
11. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN. Effect of niosomal antimicrobial peptide hbd-1 on the healing rate of infected wounds in rats. Medical News of North Caucasus. 2018;13(3):515-7. DOI: 10.14300/mnnc.2018.13093

Информация об авторах:

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, заведующий лабораторией биологически активных веществ и нанотехнологий Центра фармакологии, морфологии и биотехнологии научно-инновационного объединения ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2475

Седых Ольга Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории биологически активных веществ и нанотехнологий Центра фармакологии, морфологии и биотехнологии научно-инновационного объединения ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2475

Батурин Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии, аллергологии и иммунологии с курсом ПДО, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 71-3466

Болатчиев Альберт Добаевич, аспирант, ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2475

Ефременко Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
Телефон: (8652) 35-2475

Information about authors:

Alexander N. Maltsev, PhD (in Biology), researcher, head of the laboratory of biologically active substances and nanotechnologies of the Center of Pharmacology, Morphology and Biotechnology of the Scientific and Innovative Association, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475

Olga I. Sedykh, associate researcher of the laboratory of biologically active substances and nanotechnologies of the Center of Pharmacology, Morphology and Biotechnology of the Scientific and Innovative Association, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475

Vladimir A. Baturin, MD, PhD, DSc, professor, head of the department of clinical pharmacology, allergology and immunology, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 71-3466

Albert D. Bolatchiev, postgraduate student, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475

Anna A. Efremenko, MD, PhD, associate professor of the department of microbiology, Stavropol State Medical University
Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
Phone: (8652) 35-2475

References

1. Larijani B, Hasani SR. Overview of diabetic foot; Novel treatments in diabetic foot ulcer. DARU 2008;16 (Suppl. 1):1-6.
2. Ashtikar M, Wacke MG. Nanopharmaceuticals for wound healing – Lost in translation? Adv Drug Deliv Rev. 2018 Apr;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
3. Bazikov IA, Maltsev AN. Silicone niosomes with bactericidal and paramagnetic properties. Patent for invention RUS 2625722 18.07.2017 (In Russian).
4. Bazikov IA, Aksenov AV, Aksenov NA, Maltsev AN, Smirnov AN. Pharmaceutical niosomal gel on the basis of the substance n-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide with the antineoplastic activity to the glioblastoma. Patent for invention RUS 2627449 04.08.2017 (In Russian).
5. Bazikov IA, Aksenov AV, Selimov MA, Aksenov NA, Maltsev AN, Kornienko AV, et al. Properties of developed niosomal forms of anticancer substances N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide in treatment of glioblastoma. Medical News of North Caucasus. 2016;11(2):196-99. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11035 (In Russian).
6. Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. Journal of Nanoparticle Research. 2019;21(1):2049.
7. Bolatchiev AD, Baturin VA, Bazikov IA, Maltsev AN, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on Staphylococcus aureus strains in vitro and in vivo. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2019. DOI:10.1111/fcp.12499