

# Выделение эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови

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

Одним из главных направлений в решении проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов является создание новых антимикробных средств. Для преодоления лекарственной устойчивости перспективным решением может быть использование антимикробных пептидов (АМП). Целью данной работы являлась разработка технологии выделения эндогенных антимикробных пептидов. Использование в качестве исходного сырья лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови доноров и разделительной колонки с Сефадексом G-25 позволило оптимизировать метод выделения фракций с наибольшим содержанием эндогенных АМП. Способ обеспечивал получение 200 мл фракции, содержащей дефензин-альфа 1 в концентрации 0,335 мкг/мл. Данная технология сокращает производственный цикл, обеспечивает низкую себестоимость фармацевтических композиций с содержанием выделенных эндогенных АМП.

*Ключевые слова:* антимикробные пептиды, дефензины, нисомы, 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 из клеток крови. Бактериология. 2020; 5(1): 33–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-33-36

## Isolation of endogenous antimicrobial peptides from blood cells

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 the endogenous antimicrobial peptides (AMP) has been developed. Leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass of donors was used as the material for preparing endogenous AMP. The hydrolysate was obtained with the trypsin solution from this mass, and then the components were fractionated using the filter chromatography column (Simax CSN ISO 3585, Russia). For gel filtration, 1.5 g of Sephadex G-25 was applied to the filter surface followed by sterilizing filtration of the obtained substance through bactericidal filters having a pore diameter of 0.2  $\mu\text{m}$ . The antimicrobial peptide fractions were isolated using high performance liquid chromatography. Subsequently, AMP were encapsulated into the organosilicon niosomes.

*Key words:* 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 from blood cells. Bacteriology. 2020; 5(1): 33–36. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-33-36

**В** настоящее время в науке и медицине большое внимание уделяется веществам, воздействующим на антибиотикоустойчивую микрофлору. Одной из групп таких веществ являются антимикробные пептиды (АМП) – низкомолекулярные соединения, построенные из аминокислот и имеющие катионную или амфипатическую природу, которые 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, обеспечивающих противоифекционную защиту организма. Кроме антимикробного действия, АМП проявляют широкий спектр других биологических эффектов, что дает основание причислять их к биомодуляторным соединениям. АМП участвуют в процессах ранозаживления, способны связывать эндотоксины и проявлять противоопухолевое действие.

### 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 10.02.2020 г., принята к печати 27.03.2020 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 10.02.2020, accepted for publication 27.03.2020

Таблица 1. Данные об остаточном количестве фракции дефензина-альфа (пик 1) и фракций других дефензинов (пики 2, 3, 4)

Пик	Время, мин	Компонент	Конц., мкг/мл	Высота	Площадь	Полуширина
1	2,52	дефензин-альфа 1	0,038	13,503	288,288	16,907
2	3,27	фракции других дефензинов		3,748	74,265	18,617
3	3,82	фракции других дефензинов		0,816	26,851	21,490
4	5,61	фракции других дефензинов		1,976	30,067	14,199

Таблица 2. Данные хроматограммы фракции с наибольшим содержанием дефензина-альфа 1

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

В этой связи АМП являются перспективными молекулами-прототипами для создания новых лекарственных препаратов. Однако основным 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 полувыведения в циркулирующей плазме крови. Некоторые из этих недостатков могут быть успешно устранены с помощью выделения эндогенных антимикробных пептидов из клеток крови и их инкапсулирования в наноконтейнеры с последующей разработкой на этой основе ниосомальных гелей. Это позволит увеличить биодоступность, снизить себестоимость и повысить эффективность воздействия на антибиотикорезистентные микроорганизмы. Предварительно нами разработаны методики инкапсулирования лекарственных веществ в кремнийорганические ниосомы [3–6]. В том числе был получен гель, содержащий рекомбинантные синтетические дефензины HNP-1 и HBD-1, инкапсулированные в кремнийорганические наноконтейнеры [7]. Однако его продвижение на фармацевтический рынок представляется проблематичным из-за высокой стоимости рекомбинантных дефензинов. В этой связи стоит задача разработка технологии получения АМП из клеток крови для создания фармацевтических композиций с пролонгированной эффективностью при антибиотикорезистентности. Таким образом, 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 антибиотикостойчивыми 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), имела pH  $6,81 \pm 0,23$ , содержание аминного азота  $249,90 \pm 36,35$  мг %. Гидролизат получали ферментативным гидролизом с использованием 10 мл стерильного раствора трипсина (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург,

Россия) на 100 мл гидролизуемой смеси в течение 1 ч в растворе фосфатного буфера (pH 7,4). Гидролизат осветляли 0,6%-м раствором перекиси водорода. Гель-фильтрацию полученного гидролизата проводили с помощью разделительной колонки, на дне которой находился мелкопористый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, и 30 г Сефадекса G-25. Первую фракцию удаляли. Затем проводили гель-фильтрацию на колонке с раствором фосфатного буфера (pH 7,4). Отбирали пробу с максимальным содержанием антибактериальных пептидов массой 3–5 кДа. Для определения максимальной концентрации АМП в полученных образцах проб использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Люмахром» (Россия) при длине волны 214 нм. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер (pH 7,4). Скорость подачи подвижной фазы 150 мм<sup>3</sup>/мин. Для построения калибровочной кривой использовали стандарт дефензина-альфа 1 из наборов Cloud-Clone Corp. (США) [8, 9].

В дальнейшем АМП инкапсулировали в кремнийорганические ниосомы и получали ниосомальный гель для изучения его антимикробной активности при ранозаживлении диабетических язв, вызванных антибиотикостойчивыми микроорганизмами. В полученный раствор АМП поэтапно добавляли 100 мл сополимера полидиметилсилоксана и эфира полиоксиалкилена (ПЭГ-12 диметикона) и 400 мл воды. Получение ниосом и инкапсулирование в АМП проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом перемешивании на шейкере PSU-20i со скоростью 200 об./мин в течение 10 минут. Для формирования ниосом более мелких размеров смесь интенсивно перемешивали с использованием гомогенизатора APV-2000 (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 минут. Для сохранения физико-химических характеристик ниосом использовали 50 мл гелеобразователя Covacryl MV 60 и 20 мл триэтаноламина. Общий объем геля доводился до 1000 мл дистиллированной водой [10, 11].

### Результаты и обсуждение

Фракции с наибольшим содержанием АМП отбирали на основе предварительно определенных стандартных рекомбинантных дефензинов из наборов Cloud-Clone Corp. (США).

На рисунке 1 представлен калибровочный график определения дефензина-альфа 1, где по оси абсцисс указана концентрация АМП, а по оси ординат – площадь пика оптической плотности. Полученную фракцию низкомолекулярных пептидов стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. На рисунке 2 представлена хроматограмма общей фракции АМП. Помимо дефензина-альфа во фракции присутствовали и другие виды дефензинов. В дальнейшем полученные пептиды подвергали лиофильному высушиванию. На рисунке 3 представлена хроматограмма фракции с наибольшей концентрацией дефензина-альфа 1.

Полученные результаты показали, что использование в качестве исходного сырья лейкоцитарно-эритроцитарно-

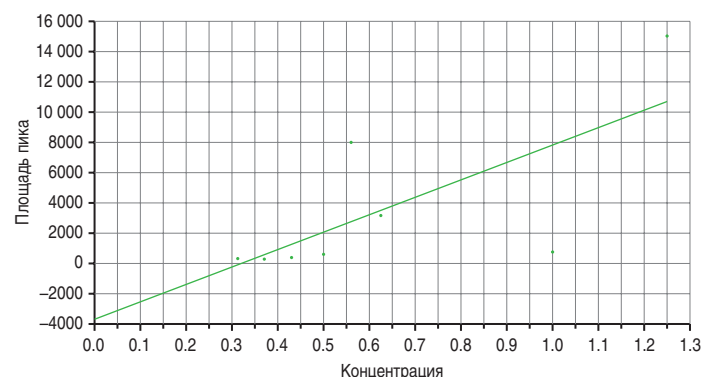


Рис. 1. Калибровочный график определения концентрации стандарта дефензина-альфа 1.

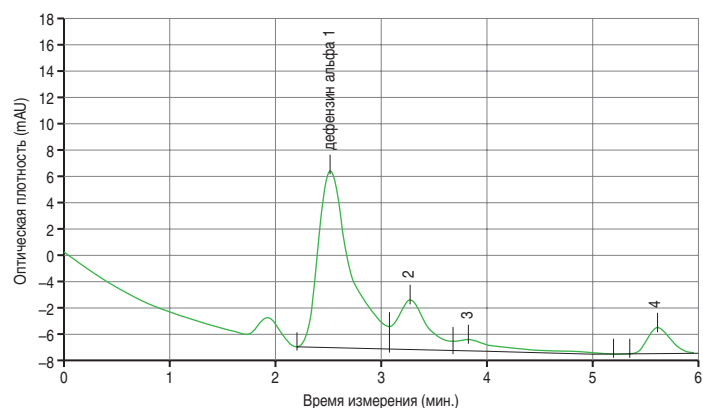


Рис. 2. Хроматограмма общей фракции АМП, полученной из лейкоцитарно-тромбоцитарной массы крови.

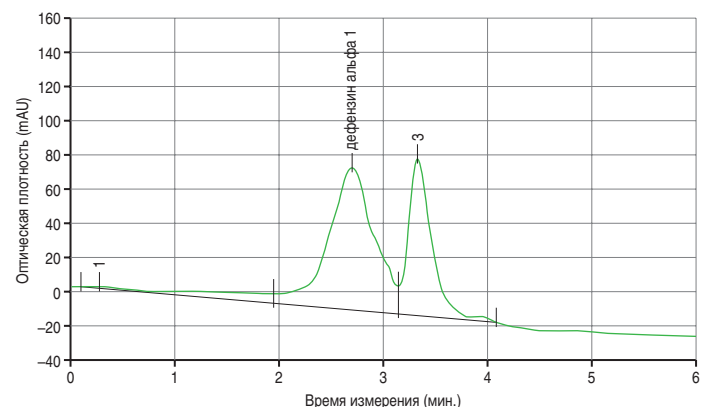


Рис. 3. Хроматограмма фракции с наибольшей концентрацией дефензина-альфа 1.

тромбоцитарной массы крови доноров и разделительной колонки с Сефадексом G-25 позволяло оптимизировать технологию выделения фракций с наибольшим содержанием в ней эндогенных АМП.

Данный способ обеспечивал получение 200 мл фракции, содержащей дефензин-альфа 1 в концентрации 0,335 мкг/мл. Применение данного метода позволяло несколько раз использовать Сефадекс G-25 после промывки, регенерации и высушивания.

Такая технология в перспективе будет значительно снижать стоимость фармацевтических композиций с содержанием выделенных эндогенных АМП.

#### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

#### Financial support

No financial support has been provided for this work.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### 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;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
- Базиков ИА, Мальцев АН. Кремнийорганические ниосомы с бактерицидными и парамагнитными свойствами. Патент на изобретение RUS 2625722 18.07.2017.
- Базиков ИА, Аксенов АВ, Аксенов НА, Мальцев АН, Смирнов АН. Фармацевтический ниосомальный 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.
- Базиков ИА, Аксенов АВ, Мальцев АН, Селимов МА, Корниенко АВ, Аксенов АН, Аксенова ИВ, Базиков ФИ. Свойства разработанной ниосомальной формы противоопухолевого вещества N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide для лечения глиобластомы. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(2):196-9.
- Diskaeva EI, Vechev OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. Journal of Nanoparticle Research. 2019;21(1):2049.
- 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. Москва, 29 ноября 2019, 138 с.
- 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.
- Базиков ИА, Мальцев АН, Седых ОИ. Разработка ниосомального лекарственного геля с альфа- дефензином hnp-1. Болатчиев А.Д. В сборнике: Биотехнология: взгляд в будущее. Материалы 4-й международной научно-практической конференции. Ставрополь, 2018, с. 87-89.
- 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):515-517.

11. 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

## References

- 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;129:194-218. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.005
- Bazikov IA, Maltsev AN. Silicone niosomes with bactericidal and paramagnetic properties. Patent for invention RUS 2625722 18.07.2017. (In Russian).
- 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).
- Bazikov IA, Aksenov AV, Maltsev AN, Selimov MA, Korniyenko AV, Aksenov AN, Aksenova IV, Bazikov FI. Properties of the developed niosomal form of the antineoplastic substance N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-Indol-3-yl)-2-phenylacetamide for treatment of the glioblastoma. *Medical News of the North Caucasus*. 2016;11(2):196-9. (In Russian).
- Diskaeva EI, Vecher OV, Bazikov IA, Maltsev AN. Dispersion analysis of niosomes different composition. *Journal of Nanoparticle Research*. 2019;21(1):2049.
- Maltsev AN, Bazikov IA, Baturin VA, Efremenko AA, Lysogora LV. Isolation of natural antimicrobial peptides from leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass. Materials of the VI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation. Moscow, November 29, 2019 P.138. (In Russian).
- 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).
- Bazikov IA, Maltsev AN, Sedykh OI. Development of niosomal drug gel with alpha-defensin hnp-1. Bolatchiev A.D. In the collection: *Biotechnology: a look to the future*. Stavropol 2018, pp. 87-89. (In Russian).
- 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 the North Caucasus*. 2018;13(3):515-7.
- 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

## 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, 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 (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

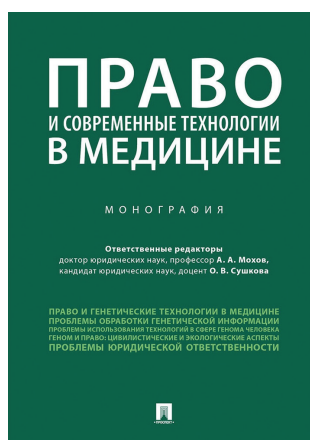
Olga I. Sedykh, associate researcher of the laboratory of biologically active substances and nanotechnologies of the Center of Pharmacology, Morphology and Biotechnology of the Scientific and Innovative Association, Stavropol State Medical University Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian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

## НОВЫЕ КНИГИ



**Право и современные технологии в медицине / под ред. А.А.Мохова, О.В.Сушкова // Издательство «Проспект». – 2019. – 368 с. – ISBN 978-5-9988-0954-5**

В настоящем издании рассматривается комплекс правовых проблем, обусловленных стремительным развитием современных технологий в медицине (генетических, информационных, репродуктивных и иных), появлением новых лекарственных препаратов для медицинского применения, биомедицинских клеточных продуктов и иных средств медицинского применения. Кроме того, в книге затрагиваются экологические аспекты появляющихся и внедряемых технологий, способных оказать существенное влияние на различные сферы человеческой деятельности, среду его обитания, биосферу. Настоящая монография является итогом работы Международного симпозиума «Право и современные технологии в медицине», который прошел в Московском государственном юридическом университете им. О.Е.Кутафина (МГЮА) 15–17 мая 2019 г. Законодательство представлено по состоянию на 15 мая 2019 г. Книга рассчитана на широкий круг читателей, так как носит междисциплинарный характер. Монография может быть рекомендована преподавателям, ученым, практическим работникам, адвокатам, аспирантам, студентам как юридических, так и медицинских и иных вузов, а также всем, кто интересуется проблемами предпринимательской, экологической, медицинской и иных сфер жизни общества.