

Лиофилизированное антимикробное средство на основе эндогенных дефензинов

И.А.Базиков¹, А.Н.Мальцев¹, А.А.Ефременко¹, М.В.Рубайло¹, Ф.И.Базиков²

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет», Ставрополь, Российская Федерация;

²Миланский государственный университет, Милан, Италия

Бесконтрольное применение антибиотиков и антисептиков во время пандемии COVID-19 привело к значительному росту инфекций, резистентных к лечению традиционными антибиотиками. На этом фоне возникла необходимость поиска антимикробных препаратов широкого действия для лечения инфекционных осложнений, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами. При использовании дефензинов у бактерий не формируется резистентность. Целью исследования являлось получение лиофилизированного антимикробного средства на основе дефензинов, последующее инкапсулирование его в кремнийорганические ниосомы и изучение его эффективности в эксперименте. Разработанный процесс лиофилизации ранее полученных эндогенных дефензинов и их последующего инкапсулирования в кремнийорганические ниосомы продемонстрировал их эффективность при заживлении ран, зараженных антибиотикорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* в эксперименте. При синергии действия двух типов пептидов продемонстрировано увеличение линейной скорости заживления инфицированных ран по сравнению с контролем.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, дефензины, лиофилизация, синергия, ранозаживление

Для цитирования: Базиков И.А., Мальцев А.Н., Ефременко А.А., Рубайло М.В., Базиков Ф.И. Лиофилизированное антимикробное средство на основе эндогенных дефензинов. Бактериология. 2021; 6(2): 23–26. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-23-26

Lyophilized antimicrobial agent based on endogenic defensins

I.A.Bazikov¹, A.N.Maltsev¹, A.A.Efremenko¹, M.V.Rubailo¹, F.I.Bazikov²

¹Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation;

²Milan State University, Milan, Italy

The uncontrolled use of antibiotics and antiseptics during the COVID-19 pandemic has led to a significant increase in infections resistant to traditional antibiotic treatment. Against this background, it became necessary to search for broad-spectrum antimicrobial drugs for the treatment of infectious complications caused by antibiotic-resistant microorganisms. When using defensins, bacteria do not develop resistance. The aim of the study was to obtain the lyophilized antimicrobial agent based on defensins, followed by encapsulation in organosilicon niosomes, and to study its effectiveness in an experiment. Developed process of lyophilization of previously obtained endogenous defensins and their subsequent encapsulation in organosilicon niosomes demonstrated their effectiveness in the healing of wounds infected with antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus* in the experiment. With the synergy of the action of the two types of peptides, the increase in the linear rate of healing of infected wounds was demonstrated as compared to the control.

Key words: antibiotic resistance, defensins, lyophilization, synergy, wound healing

For citation: Bazikov I.A., Maltsev A.N., Efremenko A.A., Rubailo M.V., Bazikov F.I. Lyophilized antimicrobial agent based on endogenic defensins. Bacteriology. 2021; 6(2): 23–26. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-23-26

Штаммы микроорганизмов, в том числе и респираторные патогены (классический пневмококк, гемофильная палочка и др.) с множественной лекарственной устойчивостью, становятся все более распространенной причиной бактериальных осложнений коронавирусной инфекции.

Возросшее из-за COVID-19 использование антибиотиков приводит к росту резистентных штаммов микроорганизмов, обусловленному в большей части генами устойчивости, расположенными на подвижных генетических элементах бактерий, что облегчает их внутривидовое распространение [1].

Для корреспонденции:

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

E-mail: ania300380@mail.ru

Статья поступила 01.07.2021 г., принята к печати 30.08.2021 г.

For correspondence:

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

E-mail: ania300380@mail.ru

The article was received 01.07.2021, accepted for publication 30.08.2021

По некоторым данным, после пандемии коронавирусной инфекции резистентных бактерий станет в 3–4 раза больше [2]. На фоне пандемии необоснованное назначение происходит в 90% случаев, однако эти препараты нужны лишь 10% пациентов, у которых развиваются бактериальные осложнения.

Перспективы применения в качестве антимикробных препаратов (АМП) широкого действия для лечения инфекционных осложнений, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами, имеют дефензины [3, 4], так как при их использовании у бактерий не формируется резистентность [5].

Предварительно нами были разработаны способы выделения из клеток крови и ткани дефензинов, продемонстрировавших высокую эффективность при подавлении роста микроорганизмов *in vitro* [6]. Однако при применении данной методики мы получаем дефензины в весьма низких концентрациях (0,3–0,4 мкг/мл). Для повышения концентрации дефензинов и увеличения сроков хранения разработана методика лиофилизации эндогенных дефензинов. Это мягкий способ сушки веществ, при котором высушиваемый препарат замораживают, а потом помещают в вакуумную камеру, в которой происходит возгонка растворителя. Преимуществами такого способа высушивания являются: отсутствие воздействия на препарат высоких температур, сохранение дисперсной фазы препарата, возможность использования летучих растворителей. Метод лиофилизации позволяет получать препарат без потери его структурной целостности и биологической активности. При лиофилизации большинство белков не подвергаются денатурации и могут длительно сохраняться при умеренном охлаждении (около 0°C). Лيوфилизированные ткани и препараты при увлажнении восстанавливают свои первоначальные свойства, а инкапсулирование в трансдермальные переносчики-ниосомы [7–9] придает им дополнительные свойства.

Таким образом, **целью исследования** являлось получение лиофилизированного антимикробного средства на основе дефензинов, последующее инкапсулирование в кремнийорганические ниосомы и изучение его эффективности в эксперименте.

Материалы и методы

Количественное определение эндогенных дефензинов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для получения дефензинов в качестве сырья использовали плацентарную ткань [3, 10]. Осуществляли вирусологический контроль (на отсутствие HBS-антител к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ), определение рН ($6,81 \pm 0,23$), содержания аминного азота ($249,90 \pm 36,35$ мг%). Ткань плаценты предварительно подвергали гомогенизации, 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 фосфатном буфере (рН 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 0,22 мкм и 30 г Сефадекса G-25. Фильтры стерилизовали с

помощью водяного пара и ультрафиолета. Первую фракцию удаляли. Затем проводили гель-фильтрацию на колонке с раствором фосфатного буфера (рН 7,4). Отбирали пробу с максимальным содержанием антибактериальных пептидов массой 3–5 кДа. Для определения максимальной концентрации АМП в полученных образцах проб использовали метод ВЭЖХ на хроматографе «Люмахром» (Россия) при длине волны 214 нм. В качестве подвижной фазы использовали фосфатный буфер (рН 7,4). Скорость подачи подвижной фазы – 150 мм³/мин. В качестве исследуемого образца использовался стандарт дефензинов альфа и бета с концентрацией 0,625–50 мкг/мл. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил. Скорость подачи подвижной фазы была 2,5 мм³/мин, объем образца 50 мкл при температуре 20°C. Детекция фракций проводилась с помощью УФ-детектора на частоте волны 214 нм. Скорость подачи подвижной фазы составлял 150 мм³/мин [6, 11].

Раствор после приготовления сразу же дозированно вносили в ампулы для инъекции. Применяли ампулы бесцветные, гидролитического класса 1, при асептических условиях, предварительно стерилизованные. Наполненные ампулы для инъекций помещали в установку для лиофильного высушивания и сушили при заданной температуре. Процесс лиофилизации растворов, адаптированный к объему лиофилизата и емкости, состоял из следующих этапов: цикл вымораживания, затем сублимации и высушивания. Лيوфилизацию осуществляли в лиофилизаторе Usifroid (Франция) типа SMH 15, SMJ 100 или SMH 2000, при этом скорость вымораживания – 2°C в минуту. Гидролизат дефензинов загружали в лиофильную сушилку при температуре +20°C, охлаждали за 1-й час до -22°C, затем в течение 2-го часа до -31°C, в течение 3-го часа до -40°C и за 4-й час до -48°C, и при этой температуре выдерживали 5 ч. Высушивание осуществляли с помощью программы высушивания при температуре плиты, повышающейся от -40°C до +20°C. Затем установку заполняли стерильным азотом, ампулы запаивали (флаконы в установке закрывали и пробки снабжали клапаном с бортиком). Проводили визуальный контроль на наружные дефекты первичной упаковки, контроль на механические включения и прозрачность проводили с применением растворения образца. Ампулы для инъекций с дефектами уничтожали.

В дальнейшем эндогенные дефензины инкапсулировали в кремнийорганические ниосомы. В качестве поверхностно-активного соединения для формирования ниосом использовали ПЭГ-12 диметикон [12]. Навеску лиофилизированного субстрата эндогенных дефензинов растворяли в стерильном растворе Хенкса, из расчета 0,05 мг эндогенных дефензинов в 1 мл раствора. В полученный раствор для формирования ниосом поэтапно добавляли 100 мл ПЭГ-12 диметикона и 400 мл воды. Начальный процесс образования ниосом и инкапсулирования в них лиофилизата проводили при комнатной температуре и интенсивном механическом встряхивании на шейкере в течение 5 мин. Стадия формирования ниосом более мелких размеров происходила при интенсивном механическом перемешивании смеси с использованием APV-гомогенизатора. Формирование ниосом размером 100–140 нм проводили следующим образом. Предварительно полученную дисперсию ниосом с инкапсулированным лекар-

ственным веществом помещали в сосуд для ультразвуковой обработки и проводили экспозицию ниосом с временными интервалами в 15, 30 и 45 мин. Для того чтобы физико-химические характеристики кремнийорганических ниосом были постоянными, использовали 50 мл гелеобразователя, который образовывал трехмерную объемную «сетку» при добавлении 20 мл триэтанолamina. Общий объем геля доводили до 1000 мл очищенной водой.

Эффективность полученного антимикробного ниосомального геля на основе эндогенных дефензинов проверяли на инфицированных ранах в эксперименте. Для моделирования экспериментальной раны использовали лабораторных крыс породы Wistar. Рану наносили с помощью инструментов для панч-биопсии (диаметр – 8 мм) на предварительно выбритую поверхность спины. В дальнейшем рану инфицировали добавлением 2 мл суспензии штаммов *Staphylococcus aureus* (стандарт мутности 0,5 по Мак-Фарланду). Площадь раны оценивали с помощью программного обеспечения Lesion Meter. Опытная группа ($n = 10$) получала ниосомальный гель на основе эндогенных дефензинов по 1 мл 2 раза в сутки. Контрольная группа ($n = 10$) получала плацебо – гель без лиофилизированного субстрата дефензинов.

Результаты и обсуждение

Лиофилизированный субстрат на основе эндогенных дефензинов представляет собой белый пористый порошок. Условия хранения полученного лиофилизата предполагают его хранение в сухом, защищенном от света месте при температуре 2–8°C.

Изучение лечения инфицированных ран на животных показало, что линейная скорость заживления ран (V , мм²) на 7-й день эксперимента составила в среднем $0,0051 \pm 0,0147$ мм² в сутки в контрольной группе (таблица). У крыс, получавших опытный образец ниосомального геля с эндогенными дефензинами в дозе 0,05 мг/мл, установлена более высокая скорость ранозаживления. Так, среднее значение V в данной группе составило $0,0236 \pm 0,0120$ мм² в сутки ($p < 0,05$). При расчете скорости регенерации раны с 7-го по 14-й день были получены аналогичные данные. Так, в контрольной группе V составила $0,0051 \pm 0,0071$ мм² в сутки, в то время как среднее значение V в опытной группе, получавшей ниосомальный гель с эндогенными дефензинами, равнялось $0,0286 \pm 0,0146$ мм² в сутки. Различия между экспериментальными группами были статистически достоверными ($p < 0,05$).

Также следует отметить, что средняя площадь ран в контрольной группе в течение первой недели эксперимента составила $4,5 \pm 1,9$ мм². В опытной группе площадь раны со-

ставила $2,1 \pm 0,86$ мм². К концу эксперимента, на 14-й день, данные показатели составили $2,1 \pm 0,86$ мм² в контрольной группе и $1,1 \pm 0,9$ мм² в экспериментальной группе (таблица). Для точного теста Фишера было принято значение площади раны ≤ 1 мм², соответствующее полной регенерации. Незаживающим ранам соответствовала площадь > 1 мм². Регенерация инфицированных антибиотикорезистентной микрофлорой ран к концу 2-й недели по сравнению с контролем была статистически значимой в группе животных, получающих ниосомальный гель с эндогенными дефензинами ($p < 0,05$).

Таким образом, опытный образец лиофилизированного антимикробного средства на основе дефензинов в конечной концентрации в ниосомальном геле в дозе 1 мкг/мл при использовании один раз в день продемонстрировал эффективность при заживлении ран, зараженных антибиотикорезистентными штаммами *S. aureus*. Полученные результаты показывают значительно увеличенную линейную скорость заживления инфицированных ран по сравнению с контролем. Предположительно, синергетическая эффективность обусловлена высокой антибактериальной активностью эндогенных дефензинов [13, 14], а также иммуномодулирующими и регенераторными свойствами входящих в пептидный комплекс низкомолекулярных пептидов плацентарной ткани [15, 16].

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ.

Financial support

The work was carried out within the framework of a state assignment Ministry of Health of the Russian Federation.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Сидоренко СВ, Тишков ВИ. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. Успехи биологической химии. 2004;44:263-306.
2. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):470-473. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: Lancet. 2020 Jan 29.
3. Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. J Appl Microbiol. 2012 Oct;113(4):723-36. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
4. Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. Methods Mol Biol. 2015;1268:43-66. DOI: 10.1007/978-1-4939-2285-7_3
5. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resist Updat. 2016 May;26:43-57. DOI: 10.1016/j.drug.2016.04.002
6. Базиков ИА, Мальцев АН, Батулин ВА, Рамеш КГ, Наджирул Амин А, Ефременко АА. Способ выделения природных антимикробных пептидов из лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарной массы крови. Патент на изобретение №2729016 от 04.08.2020.

Таблица. Динамика ранозаживления при использовании лиофилизированного антимикробного средства на основе дефензинов

Группы	Скорость заживления ран (V, мм ² /сутки)		Средняя площадь ран (S, мм ² /сутки)	
	7-й день	14-й день	7-й день	14-й день
Контроль	0,005 ± 0,015	0,005 ± 0,007	4,5 ± 1,9	3,6 ± 1,6
Опыт	0,024 ± 0,012*	0,029 ± 0,015*	2,1 ± 0,86*	1,1 ± 0,9*

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

7. Debnath A, Kumar A. Structural and Functional significance of Niosome and Proniosome in Drug Delivery System. *International Journal of Pharmacy and Engineering*. 2015;3: 621-637.
8. Rai A. Niosomes: An approach to current drug delivery – A Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*. 2017;06:41-48.
9. Sunilkumar M. Niosomes As novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Science*. 2015;5:1-7.
10. Базиков ИА, Куличенко АН, Ковалев ДА, Бинатова ВВ, Мальцев АН, Клиникова НИ, и др. Изучение химического состава пептидов в составе нiosoмального препарата «Регенерин». *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2017;12(2):176-180. DOI: 10.14300/mnnc.2017.12049
11. Diskaeva E, Vecher O, Diskaeva E, Bazikov I, Elbekyan K. Review of methods for size and morphology determination of vesicles in niosome dispersion. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*. 2020;20(3):377-81.
12. Vecher V, Diskaeva E, Bazikov I, Elbekyan K, Diskaeva E. Study of some rheological properties of niosomal dispersions of various concentrations based on PEG-12 dimethicone, 2020 *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 11 045007.
13. Bolatchiev A, Baturin V, Bazikov I, Maltsev A, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo*. *Fundam Clin Pharmacol*. 2020 Feb;34(1):102-108. DOI: 10.1111/fcp.12499
14. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Dec 16;11(1):37-51. DOI: 10.1038/nrd3591. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb;11(2):168.
15. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012 Jun;32(2):143-71. DOI: 10.3109/07388551.2011.594423
16. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D1087-93. DOI: 10.1093/nar/gkv1278
10. Bazikov IA, Kulichenko AN, Kovalev DA, Binatova VV, Maltsev AN, Kalinkina NI, et al. Study of chemical composition of peptides as a part of niosomal drug "Regenerin". *Medical News of North Caucasus*. 2017;12(2):176-180. DOI: 10.14300/mnnc.2017.12049 (In Russian).
11. Diskaeva E, Vecher O, Diskaeva E, Bazikov I, Elbekyan K. Review of methods for size and morphology determination of vesicles in niosome dispersion. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*. 2020;20(3):377-81.
12. Vecher V, Diskaeva E, Bazikov I, Elbekyan K, Diskaeva E. Study of some rheological properties of niosomal dispersions of various concentrations based on PEG-12 dimethicone, 2020 *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 11 045007.
13. Bolatchiev A, Baturin V, Bazikov I, Maltsev A, Kunitsina E. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo*. *Fundam Clin Pharmacol*. 2020 Feb;34(1):102-108. DOI: 10.1111/fcp.12499
14. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Dec 16;11(1):37-51. DOI: 10.1038/nrd3591. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Feb;11(2):168.
15. Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev Biotechnol*. 2012 Jun;32(2):143-71. DOI: 10.3109/07388551.2011.594423
16. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D1087-93. DOI: 10.1093/nar/gkv1278

References

1. Sidorenko SV, Tishkov VI. Molekulyarnye osnovy rezistentnosti k antibiotikam. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2004;44:263-306. (In Russian).
2. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):470-473. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 29.
3. Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*. 2012 Oct;113(4):723-36. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x
4. Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol*. 2015;1268:43-66. DOI: 10.1007/978-1-4939-2285-7_3
5. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat*. 2016 May;26:43-57. DOI: 10.1016/j.drup.2016.04.002
6. Bazikov IA, Mal'tsev AN, Baturin VA, Ramesh KG, Nadzhirul AA, Efremenko AA. Method of isolation of natural antimicrobial peptides from leukocyte-erythrocyte-platelet blood mass. Patent for invention No 2729016 dated 08/04/2020. (In Russian).
7. Debnath A, Kumar A. Structural and Functional significance of Niosome and Proniosome in Drug Delivery System. *International Journal of Pharmacy and Engineering*. 2015;3: 621-637.
8. Rai A. Niosomes: An approach to current drug delivery – A Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*. 2017;06:41-48.
9. Sunilkumar M. Niosomes As novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Science*. 2015;5:1-7.

Информация об авторах:

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

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник, заведующий лабораторией биологически активных веществ и нанотехнологий центра фармакологии, морфологии и биотехнологии научно-инновационного объединения «Ставропольский государственный медицинский университет»
 Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
 Телефон: (8652) 74-8135

Рубайло Марина Витальевна, аспирант кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»
 Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, 310
 Телефон: (8652) 35-2475
 E-mail: marina.rubailo@yandex.ru

Базиков Филипп Игоревич, студент магистратуры факультета науки и технологий Миланского государственного университета
 Адрес: г. Милан, Италия; 20122, ул. Festa del Perdono 7
 E-mail: philippbazikov@gmail.com

Information about authors:

Igor A. Bazikov, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University
 Address: 355017, 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
 Phone: (8652) 35-2475
 E-mail: bazikov@list.ru

Alexander N. Maltsev, PhD (Biological Sciences), 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

Marina V. Rubailo, postgraduate student of the Department of Microbiology, Stavropol State Medical University
 Address: 310 Mira str., Stavropol, 355017, Russian Federation
 Phone: (8652) 35-2475
 E-mail: marina.rubailo@yandex.ru

Philip I. Bazikov, Master's student, Faculty of Science and Technology, Milan State University
 Address: 7 Festa del Perdono str., Milan, 20122, Italy
 E-mail: philippbazikov@gmail.com