

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСА ПРИРОДНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ FLIP-7 В ЛЕЧЕНИИ ПОГРАНИЧНЫХ ОЖОГОВ КОЖИ

Семиглазов А.В.¹, Зиновьев Е.В.^{1,2}, Костяков Д.В.^{1,3}, Крылов П.К.¹, Сидельников Фон Эссен В.О.¹, Васильева А.Г.²

¹ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, e-mail: kostyakovdv@gmail.com;

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург;

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Дермальные ожоги предоставляют собой важную проблему медицинской и социально-экономической сфер жизни общества. Часто это связано с особенностями течения раневого процесса, характерными для таких повреждений. Одним из возможных путей решения данной проблемы является применение биохирургии, а именно природных антимикробных пептидов, выделяемых насекомыми. Цель исследования: оценить эффективность применения геля редкосшитых акриловых полимеров с природными антимикробными пептидами FLIP7 при лечении повреждений кожи на экспериментальной модели ожоговой раны. Настоящая работа основана на результатах экспериментального исследования с участием 60 мелких лабораторных животных (крыс), разделенных на 4 равные группы с учетом метода ведения ран: контроль (без лечения), влажно-высыхающие повязки с раствором антисептика, мазь левомеколь, гидрогель с FLIP7. В ходе эксперимента оценивались планиметрические показатели. Морфологическое исследование биоптатов ран использовалось для углубленного изучения динамики течения раневого процесса. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием общепринятых алгоритмов вариационной статистики. Альтернативная гипотеза принималась при $p < 0,05$. Установлено, что к 21-м суткам исследования на фоне применения комплекса природных антимикробных пептидов площадь ожоговой раны составила 1,5 см², что на 67,4% ($p < 0,05$) и на 58,3% ($p < 0,05$) меньше по сравнению с влажно-высыхающими повязками с йодопираном и мазью левомеколь соответственно. К окончанию наблюдения размер раневого дефекта был также минимальным в группе аппликации гидрогеля с FLIP7 – 0,3 см². В группах животных с применением влажно-высыхающих повязок с йодопираном и мази левомеколь анализируемый параметр составил соответственно 2,3 см² и 1,6 см². Результаты морфологического исследования подтверждают установленную тенденцию. Гель редкосшитых акриловых полимеров с комплексом природных антимикробных пептидов FLIP7 обладает высокой эффективностью при лечении пограничных ожогов кожи.

Ключевые слова: ожоги кожи, дермальные ожоги, заживление ран, антимикробные пептиды, FLIP7.

THE ROLE OF USING A GEL OF RARE-STITCHED ACRYLIC POLYMERS WITH A COMPLEX OF NATURAL ANTIMICROBIAL PEPTIDES FLIP-7 IN THE TREATMENT OF BORDERLINE SKIN BURNS

Semiglazov A.V.¹, Zinoviev E.V.^{1,2}, Kostyakov D.V.^{1,3}, Krylov P.K.¹, Sidelnikov Fon Essen V.O.¹, Vasilyeva A.G.²

¹ Saint-Petersburg I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, Saint-Petersburg, e-mail: kostyakovdv@gmail.com;

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg;

³ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg

Dermal burns represent an important problem in the medical and socio-economic spheres of society. This is often due to the peculiarities of the wound process characteristic of such injuries. One of the possible ways to solve this problem is the use of biosurgery, namely natural antimicrobial peptides secreted by insects. Purpose of the study: to evaluate the effectiveness of using a gel of sparsely cross-linked acrylic polymers with natural antimicrobial peptides FLIP7 in the treatment of skin lesions on an experimental model of a burn wound. This work is based on the results of an experimental study involving 60 small laboratory animals (rats), divided into 4 equal groups, taking into account the method of wound management: control (without treatment), wet-dry dressings with an antiseptic solution, levomekol ointment, hydrogel with FLIP7. During the experiment, planimetric parameters were assessed. Morphological study of wound biopsies was used for an in-depth study of the dynamics of the wound process. Statistical processing of the obtained data was carried out using generally accepted variational statistics

algorithms. The alternative hypothesis was accepted at $p < 0.05$. It was found that by the 21st day of the study, with the use of a complex of natural antimicrobial peptides, the area of the burn wound was 1.5 cm^2 , which is 67.4% ($p < 0.05$) and 58.3% ($p < 0.05$) less compared to wet-dry dressings with iodopirone and levomekol ointment. By the end of the observation, the size of the wound defect was also minimal in the hydrogel application group with FLIP7 – 0.3 cm^2 . In groups of animals using wet-dry dressings with iodopirone and levomekol ointment, the analyzed parameter was 2.3 cm^2 and 1.6 cm^2 , respectively. The results of the morphological study confirm the established trend. A gel of rare cross-linked acrylic polymers with a complex of natural antimicrobial peptides FLIP7 is highly effective in the treatment of borderline skin burns.

Keywords: skin burns, dermal burns, wound healing, antimicrobial peptides, FLIP7.

Термические поражения представляют собой важную медико-социальную проблему современного общества. Ежегодно в Российской Федерации ожоги кожи получают более 100 000 человек, 20% из которых часто нуждаются в госпитализации в отделение интенсивной терапии. При этом показатель летальности остается на относительно высоком уровне – 7,1% и не имеет тенденции к снижению. Более половины травм относятся к поражениям дермального характера (II степени по МКБ-10) [1]. В последнее время данный вид повреждений приобретает статус наиболее значимых травм ввиду трудности в диагностике и подборе адекватной тактики лечения.

Основной задачей медицинской науки, в том числе комбустиологии, является постоянный поиск возможностей улучшения существующих способов лечения и новых методов ведения пациентов с ожогами кожи [2]. На данный момент врачам хирургического профиля доступно огромное количество различных современных раневых покрытий, благодаря которым возможно создать все условия для активации репаративных процессов поврежденных тканей [3]. Однако пограничные поражения требуют специфического подхода, основанного на фазах течения раневого процесса [4]. К особенностям последних при дермальных ожогах можно отнести увеличение длительности фазы альтерации воспалительного процесса и замедление пролиферации. Отсутствие адекватного лечения такого вида травм в большинстве случаев приводит к более глубоким необратимым ишемическим изменениям глубжележащих тканей, находящихся в состоянии парабиоза [5].

На сегодняшний день традиционными методами лечения пограничных ожоговых ран являются закрытый (повязочный) и открытый методы. Основой первого является поэтапное высушивание раны до формирования струпа с использованием хлопчатобумажной марли с растворами антисептиков или мазями на водорастворимой полиэтиленгликолевой основе [6]. Недостатками данного метода лечения пограничных ожоговых ран служат болевой синдром и повреждение эпидермальных регенератов при проведении смены повязок. Основой открытого способа является использование мазей без применения перевязочных средств. При этом снижается эффективность защиты раны от воздействия внутрибольничных микроорганизмов [7].

Основной причиной неудовлетворительных результатов лечения пострадавших с

дермальными ожогами представляется наличие гнойно-воспалительного процесса в зоне дефекта. Данная проблема напрямую связана с вегетирующей микрофлорой на ожоговой ране [8]. Основопологающей задачей при лечении пострадавших с пограничными ожогами кожи является подавление условно-патогенных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, вегетирующих в ожоговой ране [9]. По данным многочисленной медицинской литературы выделяют огромную группу микроорганизмов под аббревиатурой ESKAPE [10]. К ним относят *метицилин-резистентный Staphylococcus aureus (MRSa)*, *ванкомицин-резистентный Enterococcus faecium (VRE)*, *фторхинолон-резистентный Pseudomonas aeruginosa (FQRPa)*, *карбонем-резистентные Klebsiella pneumoniae (CRKP)*, *acinetobacter baumannii (CRa)* и *Enterobacteriaceae spp. (CRE)* [11]. Отличительными особенностями современных микроорганизмов являются их высокая степень распространенности и устойчивость ко многим антибактериальным препаратам, используемым сегодня. Резистентность микроорганизмов при применении современных антибактериальных препаратов связана с их выработкой защитного механизма в виде формирования биопленок [12].

Одним из новых и эффективных способов решения данной проблемы является современная биохирургия, а именно использование продуктов жизнедеятельности насекомых рода *Lucilia* и *Calliphora* [13]. Благодаря современным технологиям появилась возможность выделить и объединить в одном лекарственном средстве несколько видов природных антимикробных пептидов [14]. Одним из них является комплекс FLIP7 (ООО «Аллофарм», Россия), который включает в свой состав дефензины, цекропины, диптерицины, пролин-богатые пептиды. Данный комплекс получен в Санкт-Петербургской биотехнологической компании «Аллофарм», целями которой являются поиск, разработка и коммерциализация новых лекарственных веществ, прототипами которых служат активные компоненты иммунной системы насекомых с противовирусным, противоопухолевым и антимикробным действием. На сегодняшний день данный комплекс продемонстрировал великолепные результаты в лечении заболеваний кожи и мягких тканей, осложненных бактериальной инфекцией, в том числе с формированием биологических пленок [15]. Внедрение данного лекарственного средства в алгоритмы лечения пострадавших с пограничными ожогами кожи позволит улучшить результаты оказания медицинской помощи такой категории пострадавших.

Цель исследования: оценить эффективность применения геля редкосшитых акриловых полимеров с природными антимикробными пептидами FLIP7 при лечении повреждений кожи на экспериментальной модели ожоговой раны.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проводилось

на базе научно-исследовательской лаборатории экспериментальной хирургии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. В работу было включено 60 мелких лабораторных животных (крыс) линии Wistar массой 240 г. Все животные были разделены на 4 равные группы с учетом выбранного способа лечения: контроль (без лечения), влажно-высыхающие повязки с йодопионом, повязки с мазью левомеколь, повязки с гидрогелем с FLIP7. Все манипуляции, проводимые над животными, совершались с выполнением условий общей анестезии (препарат «Золетил 100») и с соблюдением требований всех международных нормативно-правовых документов и этических норм. Ожоговая рана площадью 14 см², или 10% п.т., моделировалась путем нагревания металлической пластины до 95–97 °С и ее последующей аппликации на участок кожи крысы. Длительность экспозиции составляла 10 с. Перевязки испытуемых животных проводились ежедневно. При этом оценивались внешний вид раны, характер отделяемого, наличие и вид формирующейся грануляционной ткани, объем некроза, а также тенденция к эпителизации раны. Эффективность используемых методов лечения анализировалась с применением планиметрического, цитологического и морфологического методов. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, с Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

Отбор биоптатов для гистологического и цитологического исследований осуществляли на 3-и, 13-е, 18-е сутки. Биоптаты ран были представлены фрагментами ткани размером 1 см², которые резецировались на границе раневого дефекта и интактного кожного покрова. Цитологическая картина анализировалась путем исследования мазков-отпечатков с использованием световой микроскопии. Результаты исследований аккумулировались в базах данных, созданных в компьютерных программах MS Excel и SPSS Statistics 17.0. Для работы с данными применялись как абсолютные/относительные значения, так и процентные показатели. Статистическая значимость полученных различий оценивалась с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Выбор критерия основывался на объеме выборки и подчинении закону нормального распределения, который определялся критерием согласия Колмогорова–Смирнова. Альтернативная гипотеза принималась при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Динамика восстановления кожного покрова является основным критерием эффективности проводимого лечения.

Таблица 1

Результаты планиметрической оценки пограничных (дермальных) ожоговых ран с учетом выбора метода лечения

Наименование метода лечения	Площадь раны, см ² , M±m			
	7-е сутки наблюдения	14-е сутки наблюдения	21-е сутки наблюдения	28-е сутки наблюдения
Контроль (без лечения)	14±1,9	8,3±2,0	5,7±1,6	3,8±1,2
Влажно-высыхающие повязки с йодопираном	12,7±1,9 ¹	5,7±2,1 ¹	4,6±2,2	2,3±1,6 ¹
Повязки с мазью левомеколь	12,1±1,8 ¹	4,6±1,7 ¹	3,6±1,5 ¹	1,6±0,9 ¹
Повязки с гидрогелем с FLIP7	11,8±2,7 ¹	3,7±1,0 ^{1,2}	1,5±0,7 ^{1,2,3}	0,3±0,1 ^{1,2,3}

Примечание – U-критерий Манна–Уитни: ¹ p<0,05 по сравнению с группой контроля; ² p<0,05 по сравнению с результатами применения влажно-высыхающих повязок; ³ p<0,05 по сравнению с результатами применения мази левомеколь

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что аппликация гидрогеля с FLIP7 на экспериментальную ожоговую рану обладала высокой эффективностью на всех контрольных точках исследования. Уже к 7-м суткам наблюдения удалось добиться сокращения ожоговой раны до 11,8 см², что на 15,7% (p<0,05) меньше относительно группы контроля. К исходу второй недели наблюдения отмечено интенсивное сокращение площади экспериментальной раны во всех группах сравнения. Наибольшее изменение указанного параметра зафиксировано в группе с использованием гидрогеля с FLIP7 – 3,7 см². К 21-м суткам исследования на фоне применения комплекса природных антимикробных пептидов площадь ожоговой раны составила 1,5 см², что на 67,4% (p<0,05) и на 58,3% (p<0,05) меньше по сравнению с влажно-высыхающими повязками с йодопираном и мазью левомеколь соответственно. К окончанию наблюдения размер раневого дефекта был также минимальным в группе аппликации гидрогеля с FLIP7 – 0,3 см². В группах животных с применением влажно-высыхающих повязок с йодопираном и мази левомеколь анализируемый параметр составил соответственно 2,3 см² и 1,6 см². Полное восстановление кожного покрова было зафиксировано на 29-е сутки в группе, где применялась аппликация гидрогеля с FLIP7, в то время как в остальных группах раневая поверхность была представлена продолжающейся вялой краевой эпителизацией с тенденцией к самостоятельному заживлению либо ранами, требующими оперативного лечения.

Результаты морфологических исследований подтверждают, что аппликация гидрогеля с природными антимикробными пептидами FLIP7 позволяет оптимизировать течение раневого процесса в ожоговой ране, обеспечивая ускорение ее очищения и более раннее

начало эпителизации (табл. 1). Установлено, что на 3-и сутки в группе животных, где применялись влажно-высыхающие повязки с йодопироном, раневой дефект был представлен остатками некротических тканей, фрагментами лейкоцитов и деформированных эритроцитов, фибрином, формирующими толстую пленку. К 18-м суткам на поверхности ожоговой раны был отмечен низкодифференцированный эпителий с участками, покрытыми фибриновой пленкой и лейкоцитами. Дно раны было представлено молодой формирующейся грануляционной тканью, лимфоцитами (рис. 1).

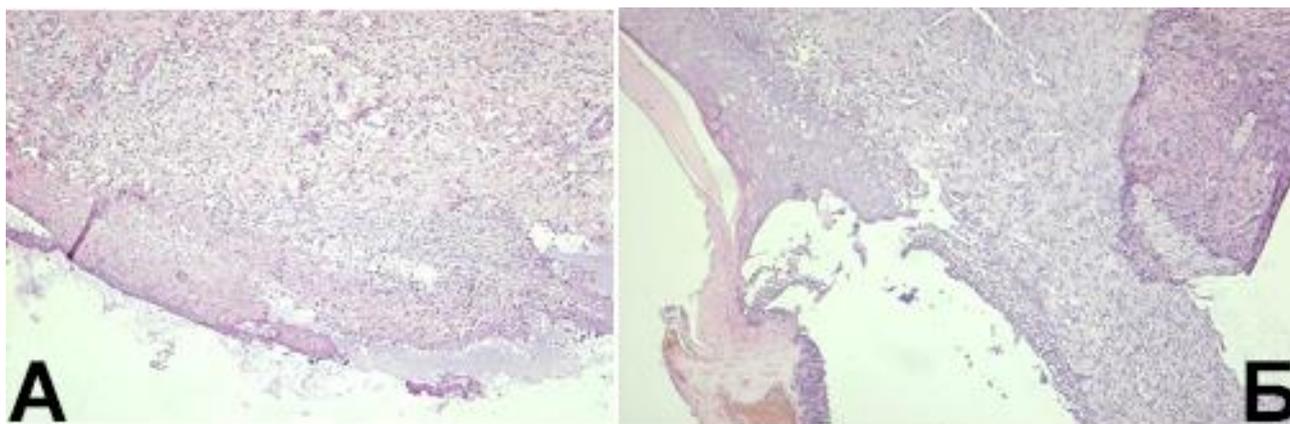


Рис. 1. Кожа крысы в группе животных, лечение которых осуществлялось с применением влажно-высыхающих повязок с йодопироном. А – 3-е сутки наблюдения; Б – 18-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 100$

Лечение дермальных ожоговых ран многокомпонентной антибактериальной мазью на гидрофильной основе левомеколь на 3-е сутки позволило добиться формирования тонкого светло-коричневого струпа с выраженными признаками секвестрации. В области созревающих соединительнотканых структур не отмечаются четкие границы, образуется тонкая пленка, представляющая собой некротизированные массы. На 18-е сутки наблюдения дно раны было представлено формирующейся грануляционной тканью со слабовыраженной инфильтрацией лимфоцитами. Также была отмечена краевая эпителизация с признаками дифференцировки клеток (рис. 2).



Рис. 2. Кожа крысы в группе животных, лечение которых осуществлялось с применением мази левомеколь. А – 3-е сутки наблюдения; Б – 18-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 100$

Наибольшую эффективность в лечении экспериментальных ран продемонстрировал гель редкосшитых акриловых полимеров с комплексом природных антимикробных пептидов FLIP7. На 3-е сутки лечения было отмечено формирование тонкого светло-коричневого струпа с признаками активной краевой секвестрации. Однако по сравнению с вышеуказанными методами лечения в данном случае признаки воспалительной реакции отсутствовали. Была зафиксирована гиперемия кожного покрова по периферии пограничного ожога. В зоне дефекта отмечались наличие тонкой полоски струпа, признаки диффузной лимфоцитарной и нейтрофильной инфильтрации, умеренный отек. К 18-м суткам наблюдения в данной экспериментальной группе было отмечено сокращение размера раны на 90% от первоначальных показателей. В зоне дефекта были зафиксированы участки активного роста и деления высокодифференцированных эпителиальных клеток. Также был отмечен незначительный признак лимфоцитарной воспалительной инфильтрации (рис. 3).

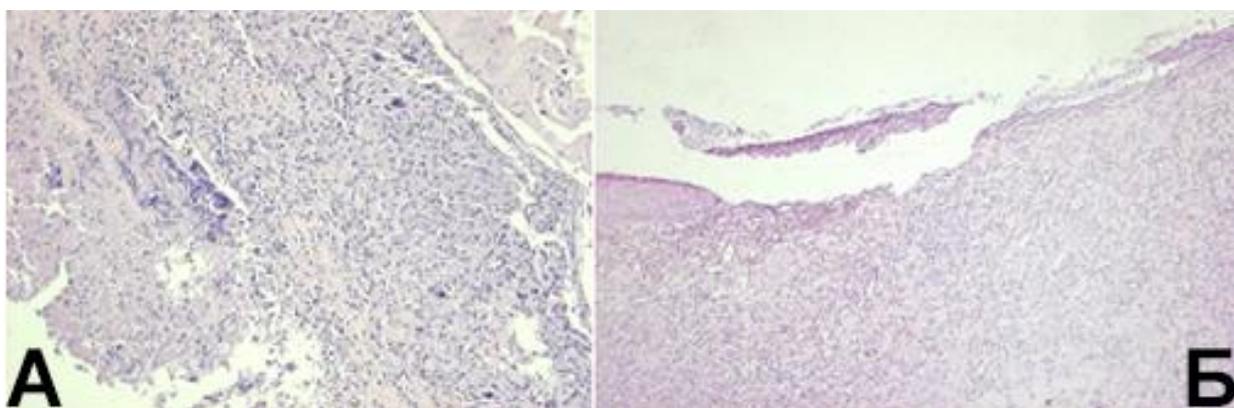


Рис. 3. Кожа крысы в группе животных, лечение которых осуществлялось с применением геля редкосшитых акриловых полимеров с FLIP7. А – 3-е сутки наблюдения; Б – 18-е сутки наблюдения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 100$

В ходе самого исследования в группе животных, где проводилось лечение ран с помощью гидрогеля с FLIP7, была зафиксирована минимальная частота инфекционных осложнений – 5% (только 2 наблюдения), в отличие от остальных групп. Летальность в данной группе животных произошла в одном наблюдении. В группах, где применялись традиционные методы лечения, процент осложнений составил 25% и 30%. Наихудшие результаты были зафиксированы в группе животных без проводимого лечения. Частота случаев нагноения ожоговых ран в группе экспериментальных животных, у которых обработка раневых поверхностей не проводилась, составила 55% при показателе летальности в 35%.

Во время экспериментального исследования была проведена оценка состояния подопытных животных, в ходе которого негативная поведенческая реакция на действие лекарственного средства не была зафиксирована. Масса тела выживших подопытных животных по окончании экспериментального исследования соответствовала показателям до проведения опыта ввиду ежедневного контрольного учета выделяемого корма на каждую особь. С учетом ежедневного контроля питания в виде постоянного объема пищи нарушение аппетита у подопытных животных на всем протяжении исследования не было зафиксировано.

Заключение. На сегодняшний день существует огромное количество различных средств местного лечения пограничных ожогов кожи. Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о большей эффективности анализируемого геля редкошитых акриловых полимеров с природными антимикробными пептидами FLIP7 относительно традиционных методов лечения пограничных ожогов кожи. Внедрение указанного ранозаживляющего препарата в алгоритмы лечения обожженных позволит улучшить результаты лечения пострадавших с пограничными ожогами кожи.

Список литературы

1. Ржеусский С.Э., Шульмин А.В., Антонова, Е.Г., Атрощенко В.А. Анализ структуры затрат для проведения фармакотерапии термических ожогов // Вестник фармации. 2022. № 2. С. 38-45.
2. Зиновьев Е.В., Попов А.А., Костяков Д.В. Возможности низкотемпературной воздушной плазмы коронного разряда и частотно-модулированного сигнала электрического поля в лечении ран кожи // Russian Biomedical Research. 2021. Т. 6. № 4. С. 10-14.
3. Борисов В.С. Применение биodeградирующих раневых покрытий в лечении донорских и ожоговых ран у пациентов с термической травмой // Актуальные проблемы медицины. 2023. Т. 46. № 1. С. 79-91.

4. Кобелев К.С., Мидленко О.В., Мидленко В.И. Пути оптимизации местного консервативного лечения пограничного ожога // Журнал Неотложная хирургия им. ИИ Джанелидзе. 2021. № S1. С. 32-32.

5. Грибань П.А., Усов В.В., Афанасов И.М., Терехов С.М., Могурян О.Е. Эффективность применения современного перевязочного средства «Хитопран» в лечении пограничных ожогов // Журнал Неотложная хирургия им. ИИ Джанелидзе. 2022. № S1. С. 18-19.

6. Владимирова О.В. опыт применения препарата повидон-йод в лечении поверхностных и глубоких ожогов // Стационарзамещающие технологии: амбулаторная хирургия. 2019. № 3-4. С. 58-64.

7. Мидленко В.И., Мензул В.А., Кобелев К.С. опыт лечения пострадавших с поверхностными и пограничными ожогами пленочными повязками Mensul dressing в сочетании с мазью левомеколь // Ульяновский медико-биологический журнал. 2016. № 2. С. 72-75.

8. Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. Патогенетическая взаимосвязь синдрома системной воспалительной реакции и шока // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2011. № 3. С. 69-75.

9. Posluszny J.A., Conrad P., Halcz M., Shankar R., Gamelli R.L. Surgical burn wound infections and their clinical implications // Journal of burn care & research. 2011. Vol. 32. Is. 2. P. 324-333.

10. Воробьева Л.Л. Пути решения антибиотикорезистентности в современной медицине // Цифровая наука. 2021. № 2. С. 4-16.

11. Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESCaPE // The Journal of Infection Diseases. 2008. Vol. 197. Is. 8. P. 1079-1081.

12. Ильина Т.С., Романова Ю.М. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39. № 2. С. 14-24.

13. Митряшов К.В., Усов В.В., Шаркова В.А. Сравнительное исследование эффективности раневых покрытий на основе гиалуроновой кислоты и атравматических повязок в местном лечении пограничных ожогов // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2021. Т. 10. № 4. С. 695-701.

14. Зиновьев Е.В. Эффективность антисептических растворов при лечении дермальных ожогов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2014. № 4. С. 173-181.

15. Chernysh S., Gordya N., Tulin D., Yakovlev A. Biofilm infections between Scylla and

Charybdis: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics // *Infection and Drug Resistance*.
2018. Vol. 11. Is. 1. P. 501-514.