

АНТИМИКРОБНАЯ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАН-ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФИЦИНА

Д.Р. Байдамина¹, Е.Ю. Тризна¹, М.Г. Холявка², А.Р. Каюмов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия,

² Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Облегчение и ускорение заживления хронических и острых ран и ожогов является важной задачей медицины. Протеолитические ферменты являются эффективным средством для восстановления тканей, поскольку они разрушают поврежденные клетки, некротический массы и уменьшают время заживления, снижают отечность и боль [1, 2]. Трипсин и химотрипсин были предложены в 1962 году для ускорения заживления ран после удаления зубов [2] и до настоящего времени широко используются в клинической практике.

Помимо различных факторов, влияющих на заживление ран, во многих исследованиях говорится о том, что бактериальные биопленки, образующиеся на поверхности ран, оказывают вредное воздействие на ранозаживление и приводят к образованию хронических инфекций [3, 4]. Как только образуется биопленка, бактерии в ней становятся чрезвычайно устойчивыми к антибактериальным препаратам и иммунной системе [5,6]. В биопленках бактериальные клетки встроены в самопродуцирующую матрицу, состоящую из полисахаридов, ДНК и белков [5, 7], что требует разработки подходов для разрушения клеток встроенных в биопленки [8]. Группой ученых было доказано преимущество протеолитических ферментов в качестве ранозаживляющих средств, поскольку они разрушают белковые компоненты матрикса биопленок и тем самым повышают эффективность антибактериальной терапии. Но так как ферменты – вещества белковой природы, они неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловому воздействию. Данные проблемы помогает решить иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях. Иммобилизованные ферменты обладают благоприятными свойствами, такими как большая устойчивость к ингибиторам, литическая активность, автолиз, многообразие биокатализатора, предотвращение агрегации фермента и взаимодействия с внешними факторами [9]. Тем не менее современные знания о преимуществах иммобилизованных протеаз как для лечения ран, так и для подавления образования биопленок весьма ограничены.

В работе использовали фицин иммобилизованный на среднемoleкулярном хитозане сотрудниками Воронежского государственного университета.

Ранее мы показали, что фицин разрушает стафилококковые биопленки и повышает эффективность различных противомикробных препаратов против клеток, внедренных в биопленку [10]. Чтобы исследовать влияние иммобилизованного на хитозане фицина на биопленки, *S. aureus* и *S. epidermidis* бактерии выращивали в 24-луночных планшетах при 37 °C на среде ВМ для образования прочной биопленки. После 48 часов культивирования, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду, содержащую фицин в растворимом и иммобилизованных формах (конечные концентрации иммобилизованного фермента и хитозана составляли 0,75, 7,5 и 75 мг/мл, что соответствует (по общей активности) 10, 100 и 1000 мкг/мл растворимого фицина). Затем проводили окрашивание остаточной биопленки кристаллическим фиолетовым.

Растворимый фицин в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл приводил к значительному уменьшению биомассы биопленок, образованных как *S. aureus*, так и *S. epidermidis* (остаточные биопленки составляли 50 % и 20 % от первоначальной, см. рис. 1). Интересно, что обработка как хитозаном, так и иммобилизованным ферментом в концентрациях 0,75 и 7,5 мг/мл приводила к умеренному разрушению биопленки, хотя различий между чистым хитозаном и хитозаном с иммобилизованным фицином не наблюдалось. По-видимому, вышеуказанный эффект является следствием механического удаления биопленки частицами хитозана. В присутствии хитозана в концентрации 75 мг/мл на пластине удерживалось в 2,5 раза больше красителя, по-видимому, из-за прилипания хитозана к поверхности. Чтобы устранить побочные эффекты, вызванные адгезией хитозана, и охарактеризовать разрушение стафилококковой биопленки иммобилизованным фицином, обработанные биопленки были проанализированы подсчетом КОЕ. Анализ показал, что обработка растворимым или иммобилизованным фицином приводила к аналогичному уменьшению жизнеспособных клеток в биопленке (рис 1В), подтверждая, что иммобилизованный фицин сохраняет активность против биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis*. Сам хитозан вызывал частичное разрушение биопленки, по-видимому, из-за механического повреждения его структуры (рис. 1).

Клетки находящиеся в составе биопленки, становятся едва доступными для биоцидов и антибиотиков. Мы проверили, повысит ли эффективность антимикробных препаратов, иммобилизованный на хитозане фицин против поверхностно-адгезивных бактерий за счет повреждения биопленки, как это было показано ранее для растворимого фицина [10].

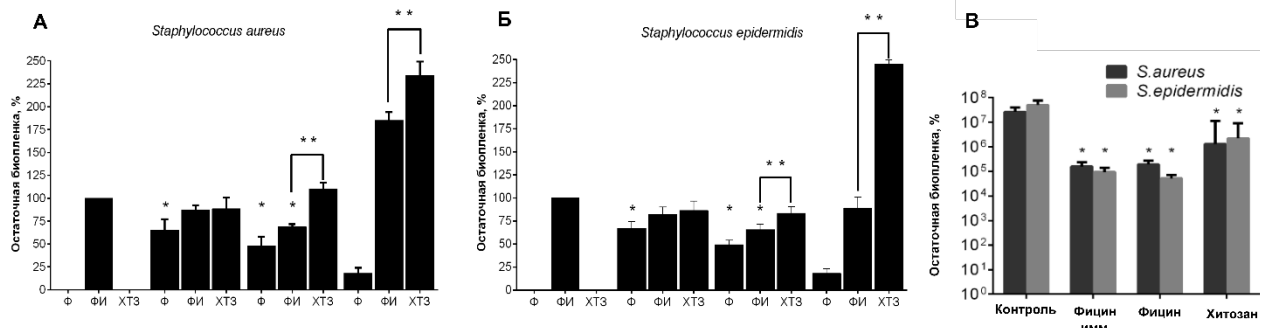


Рисунок 1 – Разрушение бактериальных биопленок фицином в растворимой и иммобилизованной на среднемолекулярном хитозане формах (где Ф – фицин, ФИ – фицин иммобилизованный, ХТЗ – хитозан)

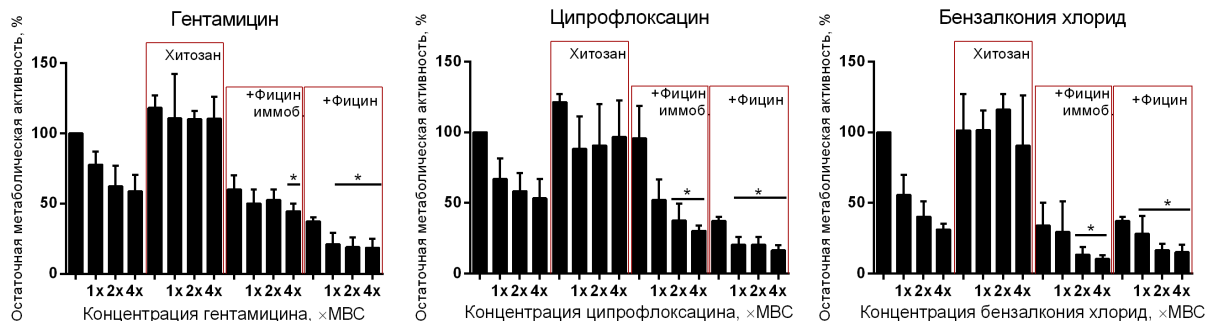


Рисунок 2 – Ферменты разрушают биопленку и повышают эффективность антибиотиков против клеток *S.aureus* в составе сформированной биопленки

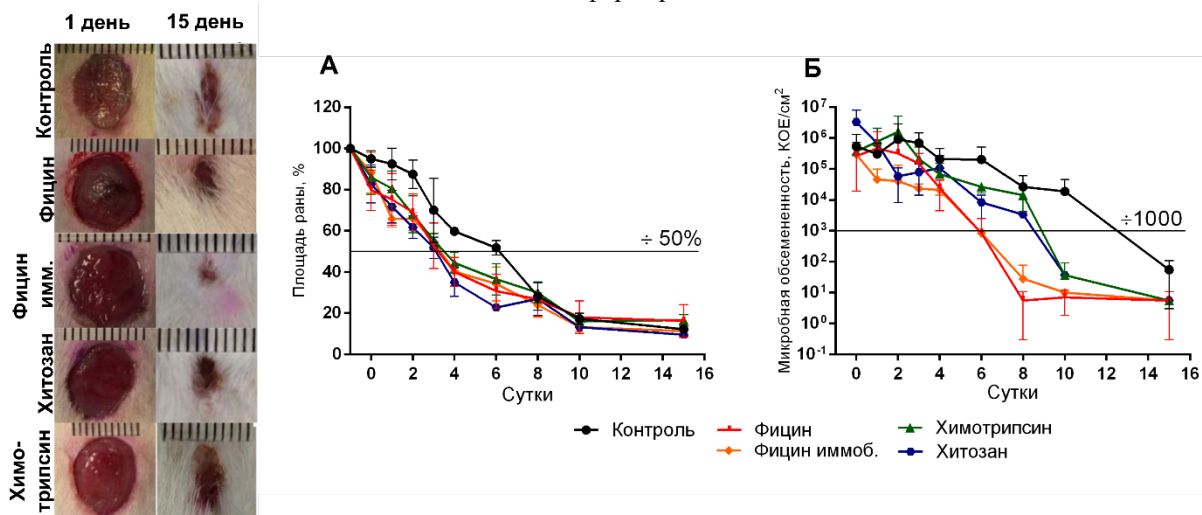


Рисунок 3 – Скорость заживления (А) и микробная обсеменённость (Б) ран на спинной части крыс при обработке раствором фицина в растворимой и иммобилизованной форме, хитозаном и химотрипсином. Контрольная группа обрабатывалась 0.9 % раствором NaCl

В соответствии с более ранними данными [10], обработка растворимым фицином значительно повышала эффективность всех антимикробных препаратов против биопленок, образованных клетками *S. aureus* (см. рис. 2). Эффект иммобилизованного фицина был менее выражен. Таким образом, достоверная разница в снижении остаточной метаболической активности клеток в составе биопленок, обработанных либо исключительно гентамицином, либо в присутствии иммобилизованного фицина, наблюдалась только при 4×МБК гентамицина.

Напротив, ципрофлоксацин и бензалкония хлорид при концентрациях, соответствующих 2–4×МБК приводили к достоверно большему снижению остаточной метаболической активности адгезированных клеток, обработанных иммобилизованным фицином. При использовании только хитозана активность всех антибиотиков также подавлялась, по-видимому, из-за дополнительного диффузного барьера или связывания антибиотиков с хитозаном. Эти данные свидетельствуют о том, что фицин, иммобилизованный на матрице хитозана, потенцирует действие антибиотиков против встроенных в биопленку бактерий, хотя и менее эффективен по сравнению с растворимым ферментом (рис. 2).

Полученные данные подтвердили эффективность как растворимого, так и иммобилизованного фицина для разрушения стафилококковых биопленок. Поскольку стафилококковые биопленки, образующиеся на поверхности ран, ранее были предложены в качестве ключевого фактора, замедляющего их заживление, влияние обеих форм фермента на заживление ран и антимикробное лечение бактериальной инфекции оценивалось с использованием модели раны кожи крыс, инфицированной *S. aureus*. Через двадцать четыре часа после повреждения кожи и заражения крыс, полученные инфицированные раны либо не лечили (контроль), либо подвергали различным сценариям обработки, включая растворимый фицин, иммобилизованный фицин, хитозан и химотрипсин в качестве второго контроля. Скорость заживления раны наблюдали в течение всего периода исследования путем измерения площади раны, скорость распространения бактериальной инфекции оценивали путем взятия мазков с раневой поверхности и с последующим подсчетом КОЕ.

Полученные результаты указывают на значительное улучшение скорости заживления ран в группах, обработанных либо растворимым, либо иммобилизованным фицином, химотрипсином и хитозаном, по сравнению с контролем (рис. 3А). Так, в группах, получавших любой вид лечения, на 4-е сутки после начала лечения наблюдалось 50 % – ное закрытие ран, в то время как в контрольной группе аналогичный эффект был достигнут только на 6-е сутки. Интересно, что на 6-й день в группах, обрабатываемых растворимым или иммобилизованным фицином, наблюдалось 3-логарифмическое падение жизнеспособности *S. aureus* в мазках из ран по сравнению с 10-м днем в группах, получавших обработку либо хитозаном, либо химотрипсином. В контрольной группе этот эффект наблюдался только на 15-й день (рис. 3Б). Таким образом, обработка ран фицином в растворимой или иммобилизованной форме значительно ускоряет заживление и усиливает микробную дезактивацию (рис. 3).

Полученные данные позволили предположить, что фицин в растворимой и иммобилизованной формах оказывает ранозаживляющее действие, что вместе с эффектом микробной деконтаминации представляет интерес для разработки ранозаживляющей терапии с применением этого фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 19–34–90061

ЛИТЕРАТУРА

1. Shah D., Mital K. The role of trypsin: chymotrypsin in tissue repair //Advances in therapy. 2018. Т. 35. – №. 1. – С. 31–42.
2. Chandanwale A. et al. A randomized, clinical trial to evaluate efficacy and tolerability of trypsin: chymotrypsin as compared to serratiopeptidase and trypsin: bromelain: rutoside in wound management //Advances in therapy. – 2017. – Т. 34. – №. 1. – С. 180–198.
3. Kirker K.R., James G.A. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review //Apmis. – 2017. – Т. 125. – №. 4. – С. 344–352.
4. Malone M. et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data //Journal of Wound Care. – 2017. – Т. 26. – №. 1. – С. 20–25.
5. Percival S.L. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds //Wound repair and regeneration. – 2012. – Т. 20. – №. 5. – С. 647–657.
6. Roy S. et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function //The Journal of pathology. – 2014. – Т. 233. – №. 4. – С. 331–343.
7. Minaev B.F. Electronic mechanisms of molecular oxygen activation //Russ. Chem. Rev. – 2007. Т. 76. №. 11. С. 989–1011.
8. Wang J. et al. Functional and bioinformatics analysis of an exopolysaccharide-related gene (epsN) from *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 //Archives of microbiology. – 2016. – Т. 198. – №. 7. – С. 611–618.
9. Klasen H.J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds //Burns. – 2000. – Т. 26. – №. 3. – С. 207–222.
10. Baidamshina D.R. et al. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – С. 46068.