

© Коллектив авторов, 2021

УДК 615.28

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16098>

ISSN – 2073-8137

СПЕКТР АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕФЕНЗИНА HNP-1, ВКЛЮЧЕННОГО В НАНОЧАСТИЦЫ ХИТОЗАНА

В. А. Батурин¹, А. Д. Болатчиев¹, А. М. Жиров², Д. А. Ковалев²

¹ Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь,
Российская Федерация

THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY SPECTRUM OF DEFENSIN HNP-1 INCLUDED IN TO THE CHITOSAN NANOPARTICLES

Baturin V. A.¹, Bolatchiev A. D.¹, Zhirov A. M.², Kovalev D. A.²

¹ Stavropol State Medical University, Russian Federation

² Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Изучена противомикробная активность антимикробного пептида из класса дефензинов HNP-1, включенного в наночастицы хитозана, в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. В условиях *in vitro* антимикробные пептиды, включенные в наночастицы хитозана, могут снижать свою противомикробную активность, что требует исследования разрабатываемых соединений на моделях экспериментальных инфекций у животных.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, дефензины, HNP-1, хитозан, антибиотикорезистентность

The antimicrobial activity of the antimicrobial peptide, defensin HNP-1 included in to the chitosan nanoparticles, against gram-positive and gram-negative bacteria was studied. *In vitro*, antimicrobial peptides included in chitosan nanoparticles can reduce their antimicrobial activity, that requires the study of the compounds being developed on models of infections in experimental animals.

Keywords: antimicrobial peptides, defensins, antibiotic resistance, HNP-1, chitosan

Для цитирования: Батурин В. А., Болатчиев А. Д., Жиров А. М., Ковалев Д. А. СПЕКТР АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕФЕНЗИНА HNP-1, ВКЛЮЧЕННОГО В НАНОЧАСТИЦЫ ХИТОЗАНА. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2021;16(4):413-414. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16098>

For citation: Baturin V. A., Bolatchiev A. D., Zhirov A. M., Kovalev D. A. THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY SPECTRUM OF DEFENSIN HNP-1 INCLUDED IN TO THE CHITOSAN NANOPARTICLES. *Medical News of North Caucasus*. 2021;16(4):XX-XX. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16098> (In Russ.)

АМП – антимикробный пептид

АМС – антимикробное соединение

МПК – минимальная подавляющая концентрация

HNP-1 – человеческий нейтрофильный пептид-1

MRSA – метициллин-резистентный штамм *S. aureus*

MSSA – метициллин-чувствительный штамм *S. aureus*

Повсеместный рост резистентности микроорганизмов к противомикробным химиопрепаратам определяет необходимость поиска и разработки новых лекарственных средств [1]. Разработка новых препаратов на основе антимикробных пептидов (АМП), являющихся важнейшим модулем системы врожденного иммунитета, является наиболее перспективной. Среди АМП большой интерес представляет человеческий нейтрофильный пептид-1 (HNP-1, или α -дефензин-1), который продуцируется и накапливается в гранулах нейтрофилов. Механизм действия положительно заряженных АМП основан на пермеабилитации отрицательно заряженной клеточной стенки бактерий с последующим микробным лизисом. Ключевой проблемой кли-

нического применения АМП является их быстрая ферментативная деградация, которая определяет короткий период действия [2]. Для решения данной проблемы в ходе данной работы было предложено использовать технологию включения HNP-1 в наночастицы хитозана [3].

Цель исследования – оценка противомикробной активности рекомбинантного АМП из класса дефензинов HNP-1, включенного в наночастицы хитозана, в отношении лабораторных и клинических штаммов микроорганизмов.

Материал и методы. Наночастицы хитозана с включенным дефензином HNP-1 (рекомбинантный пептид, Cloud-Clone Corp., США) получали методом ионной кросс-сшивки [3]. Хитозан низкой молекулярной массы растворяли в 0,5 % уксусной кислоте

до концентрации 4 мг/мл, доводили pH раствора до 4,6 и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм («Millipore», США). К раствору хитозана добавляли раствор триполифосфата натрия (4 мг/мл) и HNP-1 (0,2 мг/мл) при перемешивании на диспергаторе Ultra-Turrax («IKA», Германия) при 2500 об/мин в течение 30 мин. Затем взвесь частиц центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин при температуре 4 °С, дважды промывали водой. Полученный препарат хранили при температуре 2–8 °С. В качестве препарата сравнения использовали наночастицы хитозана, не содержащие дефензин и полученные по описанной выше методике.

Для исследования противомикробной активности полученного хитозанового HNP-1 и наночастицы хитозана использовался стандартный метод серийных разведений по описанному ранее протоколу [4]. Были определены минимальные подавляющие концентрации (МПК, мкг/мл) в отношении штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* NCTC 9001, *P. aeruginosa* ATCC 10145 и *K. aerogenes* NCTC 10006, а также клинического изолята метициллин-резистентного *S. aureus* (MRSA).

Результаты и обсуждение. Препарат нативных наночастиц хитозана в целом имел меньшие значения МПК по сравнению с HNP-1, включенным в наночастицы хитозана. Обращает на себя внимание низкая активность нативных наночастиц в отношении MRSA (16 мкг/мл), в то время как хитозановый HNP-1 имел МПК в отношении данного клинического изолята 8 мкг/мл. С другой стороны, нативные наночастицы хитозана в отношении MSSA ATCC 25923 продемонстрировали высокую антистафилококковую активность (МПК 1 мкг/мл), в то время как хитозановый дефензин оказался менее активным в отношении данного штамма (МПК 8 мкг/мл). МПК нативных на-

ночастиц хитозана в отношении *E. coli* NCTC 9001 и *K. aerogenes* NCTC 10006 составила 0,625 мкг/мл; в отношении *P. aeruginosa* ATCC 10145 – 0,25 мкг/мл. Противомикробная активность HNP-1, включенного в наночастицы хитозана, в отношении данных штаммов была ниже и значения МПК составили 2 мкг/мл для *E. coli* и *K. aerogenes* и 16 мкг/мл для *P. aeruginosa*.

По данным литературы, нативный HNP-1 имеет более высокий уровень противомикробной активности в отношении MRSA и MSSA по сравнению с хитозановым HNP-1 и нативными наночастицами хитозана. Так, ранее нами было показано, что МПК HNP-1 в отношении клинических изолятов *S. aureus* (включая MRSA) составляет 0,5 мкг/мл [4]. Кроме того, важно отметить, что в условиях *in vivo* АМП может проявлять иммуностимулирующее действие за счет активации продукции провоспалительных цитокинов и активации Т-клеток. Показано, что HNP-1 может активировать хемотаксис и индуцировать созревание дендритных клеток за счет стимулирования продукции ко-стимуляторных молекул CD80, CD86 и CD40, CD83 и HLA-DR, а также усиливать продукцию фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-6 и интерлейкина-12 [5].

Заключение. Полученные результаты демонстрируют возможность применения технологии ионной кросс-сшивки для получения новых соединений АМП, включенных в наночастицы хитозана. Вместе с тем, в условиях *in vitro* АМП, включенные в наночастицы хитозана, могут снижать свою противомикробную активность, что требует оценки клинической эффективности разрабатываемых соединений на различных экспериментальных моделях инфекций у животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavalieri M. [et al.]. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015;6:22-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
2. Pachón-Ibáñez M. E., Smani Y., Pachón J., Sánchez-Céspedes J. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017;41(3):323-342. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux012>
3. Calvo P., Remuñan-López C., Vila-Jato J.-L., Alonso M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutic. Res.* 1997;14(10):1431-1436. <https://doi.org/10.1023/A:1012128907225>
4. 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. *Fundamental Clin. Pharmacol.* 2020;34(1):102-108. <https://doi.org/10.1111/fcp.12499>
5. Presicce P., Giannelli S., Taddeo A., Villa M. L., Della Bella S. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J. Leuk. Biol.* 2009;86(4):941-948. <https://doi.org/10.1189/jlb.0708412>

Сведения об авторах:

Батурин Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии с курсом ДПО; тел.: (8652)713466; e-mail: prof.baturin@gmail.com

Болатчиев Альберт Добаевич, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры; тел.: 89288205551; e-mail: bolatalbert@gmail.com

Жиров Андрей Михайлович, научный сотрудник лаборатории биохимии; тел.: (8652)260312; e-mail: andrew.m.zhironov@inbox.ru

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии; тел.: (8652)260312; e-mail: kovalev_da.stv@list.ru