

ЛЕЧЕНИЕ РАН ЭКСТРАКТОМ ЛИСТЬЕВ ТРАНСГЕННОГО КАЛАНХОЭ С ЦЕКРОПИНОМ P1 (ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

А. С. Белоус^{1,2✉}, А. Б. Шевелев¹, Е. В. Трубникова¹, Ю. К. Бирюкова¹, Е. С. Мишина², Е. А. Лойко², А. А. Лебедева³, Н. С. Захарченко³

¹ Научно-исследовательская лаборатория «Генетика», Курский государственный университет, Курск

² Курский государственный медицинский университет, Курск

³ Пушкинский филиал, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Пущино

Проблема лечения гнойных ран актуальна в хирургии в связи с распространенностью ран различной этиологии, частотой гнойных осложнений, высокой летальностью, появлением антибиотикорезистентных штаммов бактерий. В работе исследована эффективность фармакотерапии раневого процесса экстрактом листьев трансгенного каланхоэ перистого с антимикробным пептидом цекропином P1. Гнойную рану моделировали на крысах линии Wistar с внесением в рану культуры *Staphylococcus aureus*. Сформировали 4 группы по 10 животных в каждой. Во всех группах раны обрабатывали ежедневно однократно 3 % раствором перекиси водорода и дополнительным препаратом, кроме группы 1 (контрольной). В группе 2 использовали 10 % раствор цефазолина, в группе 3 — сок каланхоэ, в группе 4 — сок каланхоэ с цекропином P1. Гистологическое исследование раневых биоптатов производили на 3, 10 и 14 сутки с начала лечения после выведения крыс из эксперимента путем передозировки наркоза. Результаты лечения через 3 сут были схожими во всех группах. Через 10 сут для ран крыс контрольной группы была отмечена незавершенность фазы экссудации, группы 2 — переход фазы экссудации в фазу регенерации, а групп 3 и 4 — покрытие грануляционной тканью. Несмотря на восстановление эпидермиса по краям ран в группах 2 и 3, кое-где сохранялся струп, а грануляционная ткань была менее зрелой, чем в группе 4. Результаты позволяют рекомендовать экстракт листьев трансгенного каланхоэ перистого с цекропином P1 для широкого клинического изучения.

Ключевые слова: раневой процесс, гнойная рана, *Staphylococcus aureus*, каланхоэ перистое, *Kalanchoe pinnata*, цекропин P1, антимикробная терапия

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0016 от 5 июня 2014 г., шифр RFMEFI60714X0016).

Благодарности: Виктору Лазаренко из Курского государственного медицинского университета и Александру Худину из Курского государственного университета за возможность выполнения экспериментальной части исследования на базе научно-исследовательских лабораторий университетов.

✉ **Для корреспонденции:** Белоус Александр Сергеевич
пр-т А. Дериглазова, д. 71, кв. 89, г. Курск, 305014; a.s.belous@mail.ru

Статья получена: 05.02.2017 **Статья принята к печати:** 18.02.2017

WOUND CARE WITH THE LEAF EXTRACT OF CECROPIN P1-PRODUCING TRANSGENIC KALANCHOE: HISTOLOGICAL FINDINGS

Belous AS^{1,2✉}, Shevelev AB¹, Trubnikova EV¹, Biryukova YuK¹, Mishina ES², Loyko EA², Lebedeva AA³, Zakharchenko NS³

¹ Research Laboratory "Genetics", Kursk State University, Kursk, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

³ Puschino branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Puschino, Russia

Management of purulent wounds is a problem that requires particular attention: wounds are a common injury type for which suppurative complications are frequent, mortality rates are high and antimicrobial therapy may be ineffective due to the presence of drug-resistant bacteria in the wound. In this work we have studied the effectiveness of wound treatment with the leaf extract of transgenic *Kalanchoe pinnata* modified to produce antimicrobial peptide cecropin P1. Purulent wounds infected with *Staphylococcus aureus* were modeled in Wistar rats. Four groups of animals were formed, with 10 animals in each group. In all groups, the wounds were cleansed with 3 % hydrogen peroxide solution once a day; all groups except the controls received additional treatment. Group 2 received 10 % cefazolin solution, group 3 received kalanchoe juice, group 4 received the juice of cecropin P1-producing kalanchoe. Histologic stains of biopsy samples were performed after rats were sacrificed by anesthetic overdose on days 3, 10 and 14 after treatment onset. On day 3, wound dynamics was the same in all groups. On day 10 exudate was still observed in the controls; in group two exudation was almost finished and regeneration was about to begin; in groups 3 and 4 the wound defect was filled with granulation tissue. In spite of epidermal repair along the wound edges in groups 2 and 3, there still was some sloughing and granulation tissue was less mature than in group 4. We recommend conducting more extensive clinical research of the leaf extract of cecropin P1-containing transgenic *Kalanchoe pinnata*.

Keywords: wound healing, purulent wound, *Staphylococcus aureus*, *Kalanchoe pinnata*, cecropin P1, antimicrobial treatment

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant No. 14.607.21.0016 dated June 5, 2014, ID RFMEFI60714X0016).

Acknowledgements: we thank Viktor Lazarenko of Kursk State Medical University and Alexandr Khudin of Kursk State University for providing full access to the research facilities of both universities.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandr Belous
prospect A. Deriglazova, d. 71, kv. 89, Kursk, Russia, 305014; a.s.belous@mail.ru

Received: 05.02.2017 **Accepted:** 18.02.2017

Актуальной проблемой современной хирургии является лечение гнойных ран, что связано с распространенностью ран различной этиологии, частыми гнойными осложнениями, высокой летальностью, значительными затратами на лечение [1, 2]. По данным некоторых авторов, в структуре хирургических заболеваний гнойные осложнения составляют 30–35 %, а смертность от них достигает 25 % [3–5].

Существует много методов лечения гнойных ран [6–10], в том числе разрабатываются и внедряются новые методы: гипербарическая оксигенация, лазерная терапия, магнитотерапия, управляемая абактериальная среда и др. [11–15]. Однако основным является метод лечения ран под повязкой — благодаря его доступности, простоте и экономичности [16–18].

Следует отметить, что массовое и бесконтрольное применение антибактериальных препаратов приводит к появлению микрофлоры, малочувствительной или нечувствительной к ним. Этот факт имеет особое значение при сложных хронических заболеваниях, например при лечении трофических язв у больных сахарным диабетом, где длительная антибактериальная терапия является обязательной [19, 20]. В таких случаях перспективно применение антимикробных пептидов, которые считаются альтернативой традиционным антибиотикам, а также использование биостимуляторов с ранозаживляющей активностью, к которым относится каланхоэ.

Многие растения рода *Kalanchoe* являются лекарственными: их сок используется для лечения ожогов, кожных ран, язв; они применяются как биостимуляторы при пересадке кожи. В соке каланхоэ содержатся флавоноиды, включая буфадииенолы, лектины, обладающие митогенной активностью в отношении лимфоцитов, витамины, органические кислоты, полисахариды, антиоксиданты и микроэлементы [21, 22]. В настоящее время получены трансгенные растения — биореакторы для получения фармацевтических субстанций — на основе видов *K. daigremontiana* [23, 24], *K. laciniata* [25] и *K. blossfeldiana* [26]. Наиболее ценным для фармакологии считается каланхоэ перистое (*K. pinnata*). В 2012 г. был разработан метод генетической трансформации каланхоэ перистого, в результате которой в растении экспрессируется ген цекропина P1 [27].

Цекропин P1 — секреторный фактор свиной нематоды *Ascaris suum*; относится к группе линейных α -спиральных пептидов, не содержащих цистеина [28]. В отличие от цекропинов насекомых он состоит из одной длинной положительно заряженной α -спирали, имеющей в своем составе практически все аминокислотные остатки. В экспериментах *in vitro* цекропин P1 высокоактивен против патогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий [29], грибов [30] и некоторых опухолевых клеток [31], однако сведения о его антимикробной активности *in vivo* в литературе до настоящего времени не приводились.

В связи с вышеизложенным целью нашей работы являлась оценка эффективности фармакотерапии экстрактом листьев каланхоэ перистого с цекропином P1 раневого процесса на модели гнойной раны у крыс с дополнительным внесением в рану культуры *Staphylococcus aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar в возрасте 4 мес и массой 200–220 г, прошедших карантинирование в условиях вивария НИИ экологической медицины Курского государственного медицинского университета. Для исследования были взяты здоровые животные. Их

содержали в стандартной экспериментальной биологически чистой комнате с температурой воздуха 22–24 °C и при циклическом освещении (по 12 ч света и темноты). Все крысы получали гранулированный корм и фильтрованную водопроводную воду. Манипуляции проводили в одно и то же время во второй половине дня. Наркотизацию животных осуществляли внутривенным введением водного раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг веса, выведение из эксперимента — его передозировкой. В исследовании соблюдали принципы, изложенные в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986 г.).

Животных распределили по группам путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела, а также проводимым операциям и манипуляциям. Из животных с моделированной гнойной раной (с дополнительным внесением в нее культуры *S. aureus*) были сформированы следующие группы:

группа 1 (контрольная): животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода ($n = 10$);

группа 2: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой 10 % раствором цефазолина ($n = 10$);

группа 3: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой соком каланхоэ ($n = 10$);

группа 4: животные, которым производилась обработка раны 3 % раствором перекиси водорода с последующей обработкой соком каланхоэ с цекропином P1 ($n = 10$).

Животным моделировали гнойную рану под наркозом в стерильных условиях. Для этого на выбритом от шерсти участке спины площадью 20 × 20 мм, обработанном антисептиком, иссекали кожу с подкожной клетчаткой. В полученную рану вводили 1 мл раствора, содержащий 1 млрд микробных тел суточной культуры *S. aureus* 592. Для стандартизации условий лечения, предупреждения деформации раны, высыхания, загрязнения раневой поверхности и укусов другими животными над раной подшивали к коже марлевую повязку. Через 48 ч у всех животных формировалось нагноение раны со всеми характерными признаками воспаления. После снятия швов марлевую повязку удаляли, эвакуировали гной из раны и производили ее обработку один раз в день ежедневно в течение 14 суток.

Гистологическое изучение раневых биопатов производили на 3, 10 и 14 сутки от начала лечения после выведения подопытного животного из эксперимента путем передозировки наркотика (по 3 животных на каждое выведение). Забор материала осуществляли, иссекая участок мягких тканей дна и прилежащего края раны лезвием. Взятый материал сразу фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина с последующей проводкой по восходящим спиртам и заливкой в парафин по стандартной методике. Приготовленные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Микроскопирование и микрофотосъемку проводили с помощью оптической системы, состоявшей из микроскопа Leica CM E (Leica Microsystems, Германия) и окуляр-камеры «Микромед DCM-510 SCOPE» («Наблюдательные приборы», Россия) на увеличениях ×40, ×100, ×200 и ×400 крат с документированием снимков в программе Future Win Joe (Future Optics, Китай), входящей в комплект поставки окуляр-камеры. При оценке гистологических срезов обращали внимание на выраженность воспалительных реакций, сроки появления грануляционной ткани,

возникновение краевой эпителизации, а также структурную полноценность вновь образованного эпителия. Также исследовали клеточный состав ткани, непосредственно прилегающей к краям раны, а на поздних сроках — новообразованной ткани. По кариологическим признакам дифференцировали клетки волокнистой соединительной ткани. Процентное соотношение клеток различных типов рассчитывали после подсчета 100 клеток в нескольких не пересекающихся полях зрения (не менее 10).

Статистический анализ полученных данных осуществляли в программе Microsoft Excel 10.0. Рассчитывали среднее значение (M) и ошибку среднего (m) для всех показателей. Использовали двухвыборочный t -тест с различными дисперсиями для сравнения значений показателей по группам животных и определения достоверности различий между ними. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты лечения в группе 1 (контроль)

3 сутки

Гнойные раны характеризовались признаками острого гнойного воспаления. Поверхность ран была покрыта тканевым детритом, с фибрино-лейкоцитарными массами, под которыми определялись скопления лейкоцитов в состоянии распада и геморрагические участки. Ткани околораневой зоны были отечными, с выраженными признаками лейкоцитарной инфильтрации. Отек и инфильтрация проникали глубоко, до мышечной ткани. Эпителий по краям ран был утолщен, дезорганизован. Коллагеновые волокна в пределах дермы были набухшими, сосуды дермы — полнокровными и расширенными (рис. 1, А).

10 сутки

Дефект тканей был заполнен гнойно-некротическими массами, эпидермис по краям ран утолщен. На уровне дермы определялась выраженная лейкоцитарная инфильтрация, встречались макрофаги и тучные клетки (таблица), интерстициальный отек распространился в глубокие слои дермы, до мышечных волокон (рис. 1, Б).

14 сутки

В ранах сохранялась глубокая лейкоцитарная инфильтрация, некротические массы заполняли дефект тканей. По краям ран определялась отечная дерма с истонченным слоем эпидермиса. В подлежащей мышечной ткани сохранялся воспалительный отек и инфильтрация. На уровне дна ран начинала формироваться грануляционная ткань, в которой встречались микроабсцессы, заполненные лейкоцитами (рис. 1, В).

Результаты лечения в группе 2 (10 % раствор цефазолина)

3 сутки

В ранах гистологически определялись признаки острого гнойного воспаления. В зоне раневого дефекта отмечалось некротическое содержимое, воспалительная ин-

фильтрация в пределах дермы была представлена не только лейкоцитами, но и единичными нейтрофилами. В поле зрения визуализировались многочисленные макрофаги (рис. 1, Г).

10 сутки

Наблюдали активный рост и организацию соединительной ткани в пределах дермы. Данные процессы протекали в присутствии клеток фибробластического ряда и макрофагов (таблица). Отмечалась выраженная пролиферация и дифференцировка клеток эпителия (рис. 1, Д).

14 сутки

Определялись участки сформированного эпидермиса с четкой дифференцировкой слоев, но толщина превышала уровень интактной кожи. На уровне дермы имелась зрелая грануляционная ткань. В глубоких слоях определялись единичные микроочаги воспалительной инфильтрации. Восстановительные процессы в условиях инфицирования характеризовались образованием значительного количества грануляционной ткани, которая замещалась фиброзной, и наличием на месте дефекта кожи большого количества разнонаправленно расположенных коллагеновых волокон (рис. 1, Е).

Результаты лечения в группе 3 (сок каланхоэ)

3 сутки

В этой группе морфологическая картина раневого процесса была схожей с таковой в контрольной группе и группе 2. Тучные клетки активно вовлекались в процесс заживления, о чем свидетельствовало повышение общего количества клеток в околораневой зоне. В зоне раневого дефекта сохранялись остатки гнойно-некротического содержимого (рис. 2, А).

10 сутки

Краевой эпидермис начинал перемещение от периферии к дну раны, где появлялись очаги грануляционной ткани. Тонкие единичные коллагеновые волокна были хаотично расположены в окружении клеточного компонента с преобладанием фибробластов и макрофагов (таблица, рис. 2, Б).

14 сутки

В некоторых случаях отмечалась полная эпителизация зоны дефекта. В пределах дермы имелась грануляционная ткань различной степени зрелости. Коллагеновые волокна были окружены фибробластами, имели расположение преимущественно параллельное поверхности кожных покровов (рис. 2, В).

Результаты лечения в группе 4 (сок каланхоэ с цекропином Р1)

3 сутки

Полости ран были заполнены некротическими массами. Ткани содержали большое количество нейтрофилов. На уровне дермы определялись выраженный отек и расширенные капилляры (рис. 2, Г).

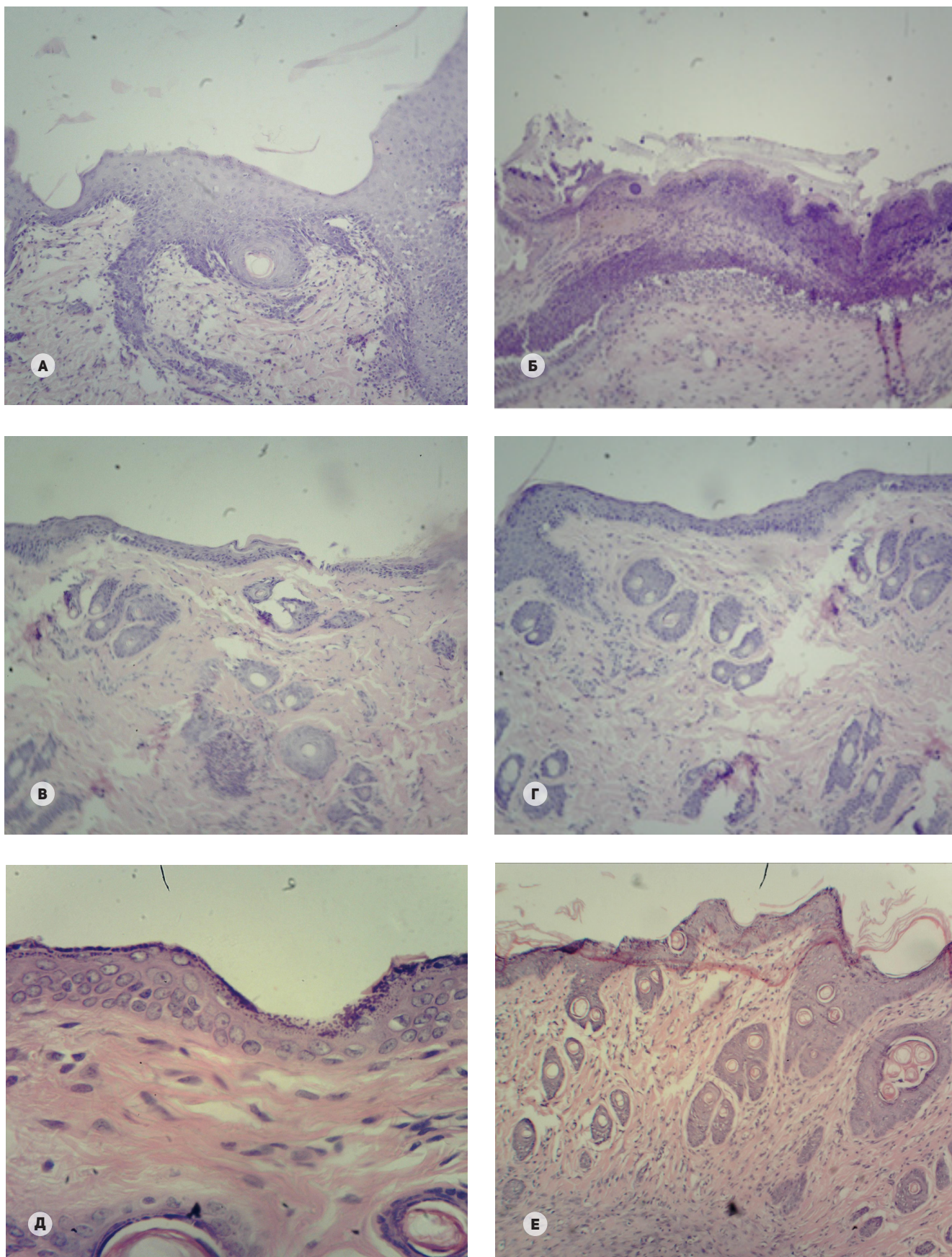


Рис. 1. Исследование раневых биоптатов крыс. (А–В) Гистологические срезы раневых биоптатов крыс контрольной группы (группы 1) на разных сроках выведения животных из эксперимента: (А) — через 3 сут, (Б) — через 10 сут, (В) — через 14 сут. (Г–Е) Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 2 (дополнительная обработка раны 10 % раствором цефазолина) на разных сроках выведения животных из эксперимента: (Г) — через 3 сут, (Д) — через 10 сут, (Е) — через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 280$

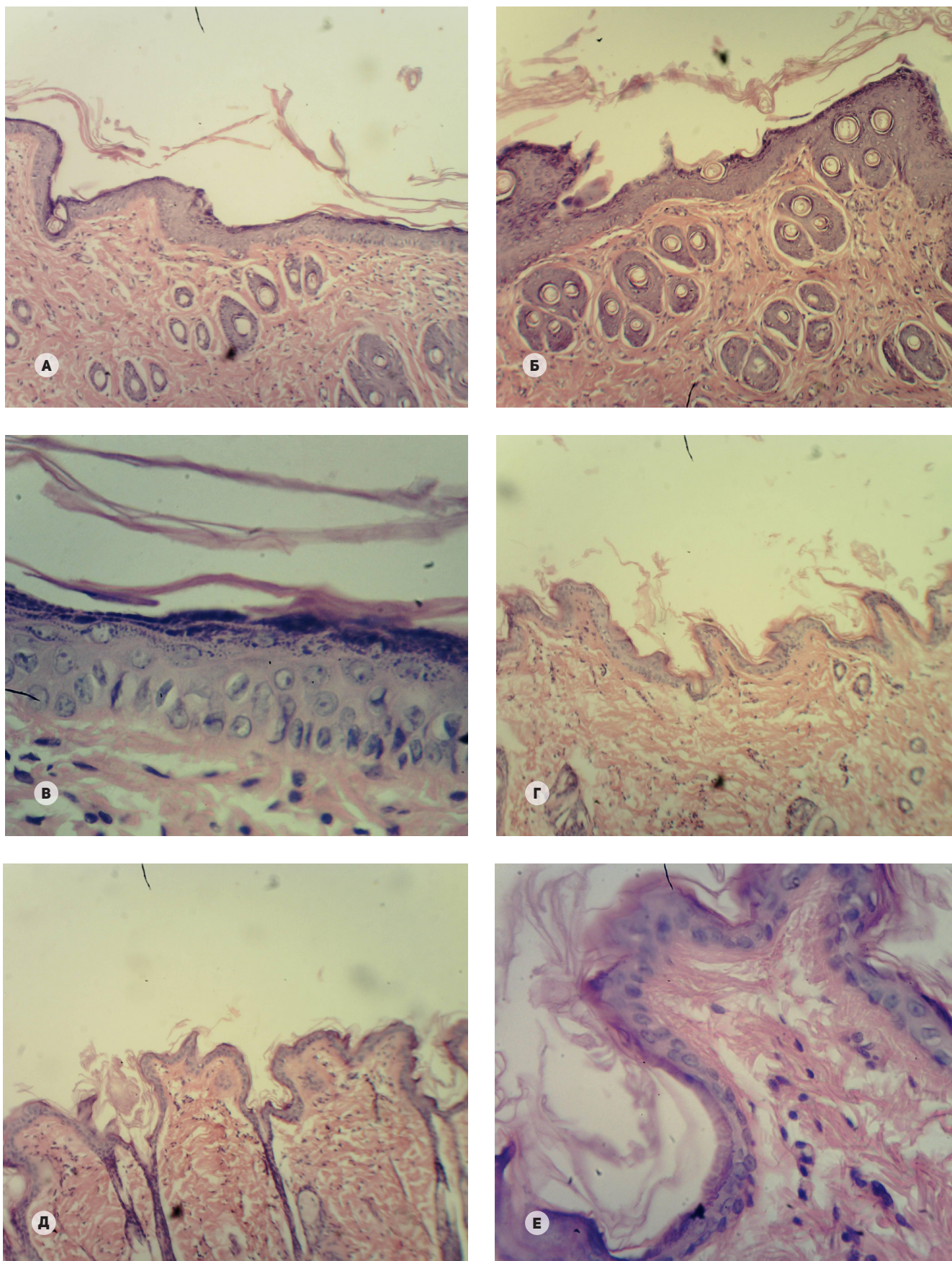


Рис. 2. Исследование раневых биоптатов крыс. (А–В) Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 3 (дополнительная обработка раны соком каланхоэ) на разных сроках выведения животных из эксперимента: (А) — через 3 сут, (Б) — через 10 сут, (В) — через 14 сут. (Г–Е) Гистологические срезы раневых биоптатов крыс группы 4 (дополнительная обработка раны соком каланхоэ с антимикробным пептидом цекропином Р1) на разных сроках выведения животных из эксперимента: (Г) — через 3 сут, (Д) — через 10 сут, (Е) — через 14 сут. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 280$

10 сутки

Регенераторные процессы характеризовались локализацией воспалительной реакции, чему способствовало образование демаркационного вала из нейтрофилов. Для воспалительного инфильтрата был характерен четко выраженный клеточный полиморфизм. Грануляционная ткань покрывала дно раны. На фоне активного ангиогенеза улучшалась васкуляризация тканей в околораневой зоне, уменьшались отек и воспалительная инфильтрация (рис. 2, Д).

14 сутки

Раневой дефект был заполнен многочисленными коллагеновыми волокнами, окруженными фибробластами. На фоне хаотичного расположения волокнистого компонента отмечалось преобладание горизонтального направления волокон. Эпителий нарастал на грануляционную ткань. Толщина эпителия превышала уровень интактной кожи (рис. 2, Е).

Сравнение результатов лечения в группах

Гистологическое исследование на 3 сутки наблюдения не выявило существенных различий в результатах лечения по группам. Однако на 10 сутки для ран крыс контрольной группы была отмечена незавершенность фазы экссудации, группы 2 — переход фазы экссудации в фазу регенерации, а групп 3 и 4 — покрытие грануляционной тканью.

На 14 сутки в срезах раневых биоптатов крыс групп 3 и 4 количество фибробластов значительно превышало количество гранулоцитов и макрофагов (таблица), что свидетельствовало об активной регенерации. Следует также отметить, что наиболее эффективной регенерация была в группе 4 (дополнительная обработка ран соком каланхоэ с цефтропином P1), в которой все раны к концу опыта были полностью покрыты новым эпидермисом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение трансгенных растений *K. pinnata*, в которых экспрессируется ген цефтропина P1 с накоплением пептида в цитоплазме клеток, описано в ряде статей, начиная с 2007 г. [30]. Опубликованы сведения об уровне накопления цефтропина P1 и его действии на фитопатогены и стандартные бактериальные культуры *in vitro*. Тем не менее ни одна из этих работ не содержит данных о терапевтичес-

кой эффективности сока трансгенных растений каланхоэ при лечении инфекций у животных. Между тем, наличие у *K. pinnata* собственной ранозаживляющей, иммуномодулирующей и ремоделирующей активности [32] позволяет ожидать усиления антимикробного эффекта цефтропина P1 при воздействии сока трансгенных растений на патогены *in vivo*.

Полученные нами результаты исследования свидетельствуют о том, что применение сока каланхоэ ускоряет переход от первой фазы воспалительного процесса к регенерации. По сравнению с контролем быстрее спадает отек, происходит очищение раны от некротических масс, раньше появляются грануляции и начинается эпителизация раны. Разнообразие клеточного состава и наличие клеток фибробластического ряда различных стадий зрелости говорит о стимулирующем воздействии изучаемых соединений на пролиферативную и функциональную активность клеток грануляционной ткани. Терапевтический эффект сока каланхоэ с цефтропином P1 наиболее выражен по отношению к контролю на поздних стадиях заживления раны. Результаты лечения ран дополнительной обработкой 10 % раствором цефазолина и соком каланхоэ были лучше, чем в контрольной группе, но хуже, чем при дополнительной обработке соком каланхоэ с цефтропином P1: несмотря на практически полное восстановление эпидермиса по краям ран в группах 2 и 3, на отдельных участках частично сохранялся струп, а количество различных клеточных элементов в грануляционной ткани указывало на меньшую степень ее зрелости при сравнении с грануляционной тканью в группе 4. Выявленное нами полное закрытие дефекта новообразованным эпидермисом в группе с использованием сока каланхоэ с цефтропином P1, а также появление производных кожи свидетельствуют не только об ускорении процессов регенерации, но и о полноценном восстановлении кожи за счет более активной миграции и пролиферации эндотелиоцитов и усиления ангиогенеза.

Следует отметить, что эффективность антимикробного действия сока трансгенного каланхоэ на стафилококк *in vivo* существенно превысила ту, которой можно было бы ожидать на основании известных данных об антимикробной активности этого препарата на бактериальных культурах *in vitro* [30]. По-видимому, этот эффект обусловлен сочетанием антимикробного действия цефтропина P1 и эндогенных буфадииенолов сока *K. pinnata*. Кроме того, существенный вклад в ускоренную элиминацию патогенов из раны под действием сока трансгенных растений может вносить иммуностимулирующая активность гемагглютинирующих лектинов *K. pinnata* [33]. Подобно конканавалину А

Соотношение клеточных элементов в смоделированных ранах в зависимости от типа лечения и срока выведения животных из эксперимента

Группа животных	Срок выведения животных из эксперимента, сут											
	3				10				14			
	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты	Фибробласты	Макрофаги	Гранулоциты	Лимфоциты
1 (контроль)	14,7 ± 0,7	12,9 ± 0,3	49,9 ± 1,8	22,5 ± 0,6	17,0 ± 0,4	13,3 ± 0,2	48,0 ± 2,8	21,7 ± 0,3	24,9 ± 0,5	38,7 ± 1,7	15,6 ± 0,8	20,8 ± 0,3
2 (10 % раствор цефазолина)	9,5 ± 0,2	59,3 ± 2,1	7,9 ± 0,2	23,3 ± 0,2	15,2 ± 0,1	62,4 ± 1,3	7,5 ± 0,4	14,9 ± 0,6	31,9 ± 0,7	51,7 ± 2,6	8,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1
3 (сок каланхоэ)	12,9 ± 0,6	37,1 ± 0,7	30,3 ± 1,6	19,7 ± 0,4	17,7 ± 0,2	38,9 ± 1,6	15,6 ± 0,2	27,8 ± 0,4	24,0 ± 0,6	47,3 ± 2,5	14,4 ± 0,2	14,3 ± 0,2
4 (сок каланхоэ + цефтропин P1)	12,1 ± 0,2	21,4 ± 0,4	44,0 ± 1,2	22,5 ± 0,1	20,5 ± 1,0	23,9 ± 0,4	24,2 ± 1,1	31,4 ± 2,6	30,1 ± 1,2	26,4 ± 1,6	18,4 ± 1,1	25,1 ± 1,2

или фитогемагглютинину, эти лектины способны ускорять размножение лимфоцитов, в том числе специфических к антигенам патогенов, которые скапливаются вблизи очага инфекции. Этот эффект на фоне подавления физиологических функций бактерий цекропином P1 и антимикробными факторами сока может приводить к существенному ускорению и усилению выработки антител. Наконец, ускорять элиминации патогенов из раны могут более выраженная васкуляризация и ремоделирование рубцовой ткани под действием неидентифицированных компонентов сока каланхоэ. Эти эффекты способны ускорить транспорт клеток и растворимых факторов иммунной системы к очагу инфекции, усиливая защитные реакции.

ВЫВОДЫ

В исследовании показана высокая эффективность фармакотерапии соком трансгенного каланхоэ перистого (с цекропином P1) раневого процесса на модели гнойной раны у крыс с дополнительным внесением в рану культуры

S. aureus. Полученные данные позволяют рекомендовать субстанцию для широкого клинического изучения. Сок трансгенного каланхоэ наиболее перспективен в качестве средства для лечения трофических язв у пациентов с сахарным диабетом. Для этого типа наружных поражений характерна сочетанная инфекция рядом патогенов на фоне сниженного иммунитета, при этом длительное применение антибиотиков ограничено выработкой устойчивости бактерий к ним.

Использование для лечения наружных микробных инфекций цельного сока трансгенного *K. pinnata* вместо очищенного из него атимикробного пептида позволит не только снизить затраты на очистку лекарственной субстанции, но и усилить лечебное действие цекропина P1. Таким образом, *K. pinnata* может рассматриваться как перспективный экономически эффективный и технологически доступный биореактор для получения линейки субстанций антимикробного назначения петидной и особенно белковой природы, в том числе альфа-литической протеазы, лизостафина или гирудина.

Литература

- Блатун Л. А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения. *Consilium Medicum. Хирургия*. (Прил.). 2007; (1): 9–15.
- Neal C, Buettner P, Browning S. Risk factors for wound infection after minor surgery in general practice. *Med J Aust*. 2006 Sep 4; 185 (5): 255–8.
- Абаев Ю. К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция. Ростов н/Д: Феникс; 2006. 427 с.
- Фролов А. П., Миронов В. И., Гилёва И. И. Лечение гнойно-некротических заболеваний мягких тканей в условиях хирургического стационара. В сб.: Петрова М. М., редактор. Актуальные вопросы современной хирургии: Материалы научно-практической конференции; 10–12 марта 2008 г.; Москва, Россия. М.; Красноярск: Изд-во КрасГМА; 2008. с. 457–9.
- Belda FJ, Aguilera L, García de la Asunción J, Alberti J, Vicente R, Ferrándiz L, et al. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005 Oct 26; 294 (16): 2035–42.
- Мошуров И. П., Банин И. Н., Минаков О. Е., Черных М. А. Анализ эффективности местного лечения гнойно-воспалительной патологии при использовании импульсного потока лечебного раствора. Системн. анализ и управ. в биомед. системах. 2008; 7 (1): 106–10.
- Антонюк А. В. Вакуум-терапия в комплексном лечении хронических ран [автореф. диссертации]. Ярославль: Ярославская государственная медицинская академия; 2007. 22 с.
- Гаджиев Э. А. Низкоинтенсивная лазерная и импульсная индукционная магнитотерапия в лечении гнойных ран [автореф. диссертации]. М.: Государственный научный центр лазерной медицины; 2007. 29 с.
- Гурвич Б. Л. Применение региональной дистанционной ультразвуковой санации в комплексе лечения больных с гнойными ранами (клинико-экспериментальное исследование) [автореф. диссертации]. Воронеж: Воронежская государственная медицинская академия имени Н. Н. Бурденко; 2007. 21 с.
- Исаев У. М. Лечение гнойных ран озонамагнитофорезом (клиническое исследование) [автореф. диссертации]. Махачкала: Дагестанская государственная медицинская академия; 2008. 19 с.
- Гайворонская Т. В. Экспериментальное обоснование эффективности применения непрямого электрохимического окисления крови и антиоксидантной терапии при лечении гнойных ран мягких тканей. *Стоматология*. 2008; 87 (1): 18–21.
- Загиров У. З., Исаев У. М., Салихов М. А. Клинико-морфологическое обоснование озонамагнитофореза в лечении гнойной раны. *Хирургия. Журнал имени Н. И. Пирогова*. 2008; (12): 24–6.
- Загиров У. З., Исаев У. М., Салихов М. А. Озонамагнитофорез в лечении гнойной раны. *Вестн. нов. мед. технол.* 2007; 14 (3): 207–8.
- Винник Ю. С. Карапетян Г. Э., Якимов С. В., Сычев А. Г. Использование криогенной стимуляции в лечении хронических ран. *Вестн. хир.* 2008; 167 (1): 27–8.
- Затолокин В. Д., Халилов М. А., Мошкин А. С., Юдина О. А. Опыт применения новой методики лечения гнойных ран в экспериментальных условиях. Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. 2010; (2): 160–2.
- Кузнецов Н. А., Никитин В. Г. Щадящие хирургические вмешательства и интерактивные повязки в лечении инфицированных ран. *Consilium Medicum. Хирургия*. (Прил.). 2006; (2): 39–45.
- Петрова В. В., Спесивцев Ю. А., Куликов Ю. Ф. Использование сорбирующих повязок типа «Ресорб» в лечении больных с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей при синдроме диабетической стопы в амбулаторных условиях. *Амбулат. хир. Стационарозам. технол.* 2004; 16 (4): 163–4.
- Meylan G, Tschantz P. [Surgical wounds with or without dressings. Prospective comparative study]. *Ann Chir*. 2001 Jun; 126 (5): 459–62. French.
- Жилина С. В., Миронов А. Ю., Поликарпова С. В., Пивкина Н. В. Стрептококки в этиологии гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей. *Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье»*. 2009; (2): 46–53.
- Tillotson GS, Draghi DC, Sahn DF, Tomfohrde KM, Del Fabro T, Critchley IA. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and wound infections in the United States 2005–07: laboratory-based surveillance study. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Jul; 62 (1): 109–15.
- Сажина Н. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В., Короткова Е. И., Мисин В. М. Сравнительный анализ антиоксидантной активности соков каланхоэ. *Хим. растит. сырья*. 2013; (3): 113–9.
- Akinsulire OR, Aibinu IE, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbemi T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2007 Feb 16; 4 (3): 338–44.
- Garcês HM, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malhó R, Pedroso MC, et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25; 104 (39): 15578–83.

24. Truesdale MR, Toldi O, Scott P. The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiol.* 1999 Nov; 121 (3): 957–64.
25. Григорьян А. Ю., Бежин А. И., Панкрушева Т. А., Иванов А. В., Жилиева Л. В., Кобзарева Е. В. и др. Имобилизованные формы антисептиков для лечения гнойных ран в эксперименте. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2011; (4): 25–33.
26. Sanikhani M, Mibus H, Stummann BM, Serek M. *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis* *etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.* 2008 Apr; 27 (4): 729–37.
27. Захарченко Н. С., Лебедева А. А., Бурьянов Я. И., авторы; Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемьякина и Ю. А. Овчинникова, патентообладатель. Способ получения генетически модифицированных растений каланхоэ, экспрессирующих ген цекропина P1. Патент РФ RU 2445768. 27 марта 2012.
28. Martemyanov EA, Shirin AS, Grudkov AT. Synthesis cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin. *Biotechnol Lett.* 1996; 18 (12): 1357–62.
29. Pillai A, Ueno S, Zhang H, Lee JM, Kato Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. *Biochem J.* 2005 Aug 15; 390 (Pt 1): 207–14.
30. Захарченко Н. С., Рукавцова Е. Б., Гудков А. Т., Юхманова А. А., Школьная Л. А., Кадо К. И. и др. Эспрессия искусственного гена антимикробного пептида цекропина P1 повышает устойчивость трансгенных растений картофеля к фитофторозу и белой гнили. *Докл. АН.* 2007; 415 (1): 129–31.
31. Shin SY, Kang JH, Jang SY, Kim Y, Kim KL, Hahm KS. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Feb 15; 1463 (2): 209–18.
32. Куцки П. В., Зузук Б. М. Каланхоэ перистое (Бриофиллюм чашечковый) *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Аналитический обзор. Провизор [Интернет]. 2004 [дата обращения 27 февраля 2017]; (4–6). Доступно по: http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N4/art_27.php?part_code=68&art_code=4029; http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N5/art_33.php?part_code=68&art_code=4048; http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N6/art_28.php?part_code=68&art_code=4087
33. Adenike K, Eretan OB. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *J Biochem Mol Biol.* 2004 Mar 31; 37 (2): 229–33.

References

1. Blatun LA. Mestnoe medikamentoznoe lechenie ran. Problemy i novye vozmozhnosti ikh resheniya. *Consilium Medicum. Khirurgiya*. (Suppl). 2007; (1): 9–15. Russian.
2. Heal C, Buettner P, Browning S. Risk factors for wound infection after minor surgery in general practice. *Med J Aust.* 2006 Sep 4; 185 (5): 255–8.
3. Abaev YuK. *Spravochnik khirurga. Rany i ranevaya infektsiya. Rostov-on-Don: Feniks*; 2006. 427 p. Russian.
4. Frolov AP, Mironov VI, Gileva II. Lechenie gnoino-nekroticheskikh zabolevaniy myagkikh tkanei v usloviyakh khirurgicheskogo statsionara. In: Petrova MM, editor. *Aktual'nye voprosy sovremennoy khirurgii: Proceedings of the Theoretical and Practical Conference*; 2008 Mar 10–12; Moscow, Russia. Moscow; Krasnoyarsk: Prof. VF Voino-Yasenetsky KrasSMU Press; 2008. p. 457–9. Russian.
5. Belda FJ, Aguilera L, García de la Asunción J, Alberti J, Vicente R, Ferrándiz L, et al. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005 Oct 26; 294 (16): 2035–42.
6. Moshurov IP, Banin IN, Minakov OE, Chernych MA. [Analysis of effectiveness an impuls stream of medical solution use in treatment of inflammatory wounds]. *Sistemnyi analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh.* 2008; 7 (1): 106–10. Russian.
7. Antonyuk AV. *Vakuum-terapiya v kompleksnom lechenii khronicheskikh ran* [abstract of the dissertation]. Yaroslavl: Yaroslavl State Medical University; 2007. 22 p. Russian.
8. Gadzhiev EA. *Nizkointensivnaya lazernaya i impul'snaya induktsionnaya magnitoterapiya v lechenii gnoinykh ran* [abstract of the dissertation]. Moscow: Gosudarstvennyi nauchnyi tsentr lazernoi meditsiny; 2007. 29 p. Russian.
9. Gurvich BL. *Primenenie regional'noi distantsionnoi ul'trazvukovoi sanatsii v komplekse lecheniya bol'nykh s gnoinymi ranami (kliniko-eksperimental'noe issledovanie)* [abstract of the dissertation]. Voronezh: NN Burdenko Voronezh State Medical University; 2007. 21 p. Russian.
10. Isaev UM. *Lechenie gnoinykh ran ozonomagnetoforezom (klinicheskoe issledovanie)* [abstract of the dissertation]. Makhachkala: Dagestan State Medical University; 2008. 19 p. Russian.
11. Gaivoronskaia TV. [Experimental substantiation of indirect electrochemical blood oxidation and antioxidant therapy use efficacy in the treatment of festering soft tissues wounds]. *Stomatologiya (Mosk).* 2008; 87 (1): 18–21. Russian.
12. Zagirov UZ, Isaev UM, Salikhov MA. [Clinicopathologic basis of ozonomagnetophoresis in treatment of festering wounds]. *Khirurgiya (Mosk).* 2008; (12): 24–6. Russian.
13. Zagirov UZ, Isaev UM, Salikhov MA. *Ozonomagnetoforez v lechenii gnoinoi rany.* *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii.* 2007; 14 (3): 207–8. Russian.
14. Vinnik IuS, Karapetian GE, Iakimov SV, Sychev AG. [Application of cryogenic stimulation in treatment of chronic wounds]. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2008; 167 (1): 27–8. Russian.
15. Zatolokin VD, Khalilov MA, Moshkin AS, Yudina OA. [Experience in the use of new methods of treatment of purulent wounds in the experimental conditions]. *Uchenye zapiski Orlovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Estestvennye, tekhnicheskie i meditsinskie nauki.* 2010; (2): 160–2. Russian.
16. Kuznetsov NA, Nikitin VG. *Shchadyashchie khirurgicheskie vmeshatel'stva i interaktivnye povyazki v lechenii infitsirovannykh ran.* *Consilium Medicum. Khirurgiya.* (Suppl). 2006; (2): 39–45. Russian.
17. Petrova VV, Spesivtsev YuA, Kulikov YuF. *Ispol'zovanie sorbiryushchikh povyazok tipa «Resorb» v lechenii bol'nykh s gnoino-nekroticheskimi porazheniyami nizhnikh konechnostei pri sindrome diabeticheskoi stopy v ambulatornykh usloviyakh.* *Ambulatornaya khirurgiya. Statsionarozameshchayushchie tekhnologii.* 2004; 16 (4): 163–4. Russian.
18. Meylan G, Tschantz P. [Surgical wounds with or without dressings. Prospective comparative study]. *Ann Chir.* 2001 Jun; 126 (5): 459–62. French.
19. Zhilina SV, Mironov AYu, Polikarpova SV, Pivkina NV. [Monitoring of *Streptococcus* isolated in pyoinflammatory diseases of the skin and soft tissue]. *Kurskii nauchno-prakticheskii vestnik «Chelovek i ego zdorov'e».* 2009; (2): 46–53. Russian.
20. Tillotson GS, Draghi DC, Sahm DF, Tomfohrde KM, Del Fabro T, Critchley IA. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and wound infections in the United States 2005–07: laboratory-based surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jul; 62 (1): 109–15.
21. Sazhina NN, Lapshin PV, Zagoskina NV, Korotkova EI, Misin VM. [Comparative analysis of *Kalanchoe* juice antioxidative activity]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya.* 2013; (3): 113–9. Russian.
22. Akinsulire OR, Aibinu IE, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbemi T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2007 Feb 16; 4 (3): 338–44.
23. Garcés HM, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malhó R, Pedrosa MC, et al. Evolution of asexual reproduction in leaves of

- the genus *Kalanchoe*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 25; 104 (39): 15578–83.
24. Truesdale MR, Toldi O, Scott P. The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. Plant Physiol. 1999 Nov; 121 (3): 957–64.
 25. Grigoryan AY, Bezhin AI, Pankrusheva TA, Ivanov AV, Zhilyaeva LV, Kobzareva EV, et al. [The immobilized form of antiseptics for the treatment of purulent wounds in the experiment]. Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovie". 2011; (4): 25–33. Russian.
 26. Sanikhani M, Mibus H, Stummann BM, Serek M. *Kalanchoe blossfeldiana* plants expressing the *Arabidopsis* *etr1-1* allele show reduced ethylene sensitivity. Plant Cell Rep. 2008 Apr; 27 (4): 729–37.
 27. Zakharchenko NS, Lebedeva AA, Bur'yanov YaI, inventors; Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, assignee. Sposob polucheniya geneticheski modifitsirovannykh rastenii kalankhoe, ekspressiruyushchikh gen tsekropina P1. Russian Federation patent RU 2445768. 2012 Mar 27. Russian.
 28. Martemyanov EA, Shirin AS, Grudkov AT. Synthesis cloning and expression of genes for antibacterial peptides: cecropin, magainin, and bombinin. Biotechnol Lett. 1996; 18 (12): 1357–62.
 29. Pillai A, Ueno S, Zhang H, Lee JM, Kato Y. Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. Biochem J. 2005 Aug 15; 390 (Pt 1): 207–14.
 30. Zakharchenko NS, Rukavtsova EB, Gudkov AT, Yuhmanova AA, Shkol'naya LA, Kado CI, et al. Expression of the artificial gene encoding anti-microbial peptide cecropin P1 increases the resistance of transgenic potato plants to potato blight and white rot. Dokl Biol Sci. 2007 Jul–Aug; 415: 267–9.
 31. Shin SY, Kang JH, Jang SY, Kim Y, Kim KL, Hahm KS. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. Biochim Biophys Acta. 2000 Feb 15; 1463 (2): 209–18.
 32. Kutsik RV, Zuzuk BM. Kalankhoe peristoe (Briofillyum chashechkovyi) *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Analiticheskii obzor. Provizor [Internet]. 2004 [cited 2017 Feb 27]; (4–6). Available from: http://www.provisor.com.ua/archive/2004/N4/art_27.php?part_code=68&art_code=4029;
 33. Adenike K, Eretan OB. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. J Biochem Mol Biol. 2004 Mar 31; 37 (2): 229–33.