

В.В. Воинова Д.В. Васина М.Ю. Кочевалина
Н.П. Антонова Д.А. Бриантон А.П. Бонарцев



Биоинженерные гидрогели с антибактериальной активностью

Учебно-методическое пособие



Москва 2026

УДК 604
ББК 5
В 651

Рекомендовано Ученым и Учебно-методическим советами биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в качестве учебного пособия для студентов биологического факультета.

Рецензенты:

Шайтан Константин Вольдемарович – доктор физ.-мат. наук, профессор кафедры биоинженерии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова»;

Кашина Александра Викторовна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией регенеративной медицины НИИ ЭО и БМТ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ.

Воинова, Вера Владимировна
Васина, Дарья Владимировна
Кочевалина, Марина Юрьевна
Антонова, Наталия Петровна
Бриантон, Джейсон Александр
Бонарцев, Антон Павлович

В 651 **Биоинженерные гидрогели с антибактериальной активностью.** Учебно-методическое пособие – М.: Мир науки, 2026 г. – Сетевое издание. Режим доступа: <https://izd-mn.com/PDF/33MNNPU26.pdf> – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-908127-32-5
DOI: 10.15862/33MNNPU26

В учебно-методическом пособии представлены последние достижения в области разработки и биомедицинских исследований новых полимерных систем раневых покрытий и повязок для доставки альтернативных антибиотикам лекарственных средств – антибактериальных пептидов и бактериолитических ферментов с целью борьбы с инфекциями ран и ожогов, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Рассмотрены классификация, структура, физико-химические свойства, биологическая активность и механизмы терапевтического действия антибактериальных пептидов и бактериолитических ферментов. Представлен обзор различных биоматериалов, методов изготовления и биофармакологические преимущества как средств доставки пептидов и белков гидрогелевых полимерных покрытий ран и ожогов. В отдельном разделе представлены пять заданий для практикума по исследованию формирования и свойств альгинатного гидрогеля для доставки бактериолитических ферментов, используемых для лечения инфицированных ран.

Учебно-методическое пособие разработано для реализуемых основных профессиональных образовательных программ высшего образования по направлению подготовки «Биоинженерия и биотехнология» (программ специалитета, бакалавриата, магистратуры, реализуемые последовательно по схеме интегрированной подготовки). Материалы учебно-методического пособия использованы в учебных программах Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Биоактивные молекулы» (курс лекций), «Наноразмерные лекарственные средства» (курс лекций), «Биосовместимые материалы» (курс лекций), «Полимеры микробиологического синтеза» (курс лекций) и «Биоинженерия биосовместимых полимеров» (практикум). Учебно-методическое пособие разработано в рамках проекта РФФИ № 23-74-10027.

Издание распространяется под лицензией Creative Commons CC BY 4.0

ISBN 978-5-908127-32-5

© Коллектив авторов
© ООО Издательство «Мир науки», 2026 г.



Оглавление

Список сокращений	5
Глава 1. Введение.....	8
Глава 2. Новые антибактериальные средства и системы их доставки для лечения инфицированных ран.....	22
2.1. История создания материалов раневых повязок и лекарственных средств для лечения ран и ожогов	22
2.2. Обзор современных раневых покрытий и повязок, содержащих и высвобождающих антибактериальные лекарственные вещества	26
2.3. Антибактериальные пептиды и полимерные системы их доставки как альтернатива традиционным антибактериальным препаратам для лечения инфицированных ран	50
2.3.1. Физико-химические характеристики, определяющие биологическую активность АБП	50
2.3.2. Механизмы антимикробного действия: молекулярные и химические аспекты.....	55
2.3.3. Инкапсуляция АБП: стратегии и химия взаимодействий	58
2.3.4. Механизмы высвобождения АБП и их кинетика	60
2.3.5. Классификация систем доставки АБП	63
2.3.6. Применимость различных АБП в альгинатных системах	68
2.4. Бактериолитические ферменты и полимерные системы их доставки как альтернатива традиционным антибактериальным препаратам для лечения инфицированных ран	73
2.4.1. Энзибиотики как альтернатива антибиотикам	73
2.4.2. Разнообразие природных бактериолитических ферментов и механизмов их действия.....	78
2.4.3. Лизоцимы	81
2.4.4. Основные направления применения энзибиотиков	83
2.4.5. Направленная инженерия бактериолитических ферментов.....	87
2.4.6. Применимость бактериолитических ферментов в альгинатных системах.....	88
Контрольные вопросы	90
Темы для рефератов	91
Глава 3. Практикум «Исследование формирования и свойств альгинатного гидрогеля для доставки бактериолитических ферментов, используемых для лечения инфицированных ран».....	92
3.1. Теоретическое введение	92
3.1.1. Гидрогели и альгинатный гель как их представитель: классификация и структура	92
3.1.2. Синергизм	98
3.1.3. Инкапсулирование белков в альгинатный гель	100

3.1.4. Растворение альгинатного геля	104
3.1.5. Определение активности бактериолитических ферментов	107
3.2. Практическая часть	111
3.2.1. Оборудование:	111
3.2.2. Расходные материалы:	111
3.2.3. Реактивы и готовые среды:	111
3.2.4. Задачи.....	116
Задача 1. Подготовка установки для заливки пластинок альгинатного гидрогеля и техника внесения армирующей подложки в диализный мешок	116
Задача 2. Изготовление пластинок из альгинатного гидрогеля и оценка синерезиса.....	123
Задача 3. Подготовка проб для исследования инкапсулирующих свойств альгинатного гидрогеля.....	127
Задача 4. Определение содержания белка методом Бредфорда	130
Задача 5. Определение активности бактериолитических ферментов	134
3.2.5. Оформление задач	143
Контрольные вопросы	144
Литература	145

Список сокращений

ИКМТ – Инфекции кожи и мягких тканей

АБР – антибактериальная резистентность

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

АЛГ – альгинат

ПОА (РНА) – полиоксиалканоаты

ПОБ (РНВ) – поли-3-оксибутират

БЦ (ВС) – бактериальная целлюлоза

ГК (НА) – гиалуроновая кислота

ФШ (SF) – фиброин шелка

КМЦ (СМС) – карбоксиметилцеллюлоза

ПМК (PLA) – поли-L-молочная кислота, поли(L-лактид)

ПМГК (PLGA) – полимолочная-со-полигликолевая кислота, поли(лактид-со-гликолид)

ПКЛ (PCL) – поли-ε-капролактон

ПЭГ (PEG) – полиэтиленгликоль

ПЭО (PEO) – полиэтиленоксид

ПМК-ПЭГ (PLA-PEG) – блок-сополимер поли-L-молочной кислоты и полиэтиленгликоля

ПКЛ-ПЭГ (PCL-PEG) – блок-сополимер поли-ε-капролактона и полиэтиленгликоля

PEGDA – диакрилат полиэтиленгликоля

ПВС (PVA) – поливиниловый спирт

ПВП (PVP) – поливинилпирролидон

ПАН (PAN) – полиакрилонитрил

ГА (Нар) – гидроксиапатит

ГО (GO) – графена оксид

МОКС (MOFs) – металло-органические каркасы

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЦПМ – цитоплазматическую мембрану

ВКМ – внеклеточный матрикс

3D – трехмерный

MRTF-A – связанный с миокардином транскрипционный фактор А

NF-κB – ядерный фактор каппа-Б

ГМ-КСФ (GM-CSF) – колониестимулирующий фактор

ФРЭС (VEGF) – фактор роста эндотелия сосудов

BMP-2 – костный морфогенетический белок 2 типа

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид×Н

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат×Н

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

PBS – фосфатно-солевой буфер

HBSS – раствор солей Хэнкса

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДСН – додецилсульфат натрия

EDC – карбодиимид

ММП (MMP) – металлопротеиназы

ПЭК (PEC) – полиэлектролитные комплексы

NAG – N-ацетилглюкозамин

NAM – N-ацетилмурамовая кислота

КОЕ – колониеобразующие единицы

КФ – шифр фермента в международной системе классификации ферментов, разработанной Комиссией по ферментам

ESKAPE – группа из шести высокопатогенных и устойчивых к антибиотикам видов бактерий: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*

MRSA – метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*)

АБП – антибактериальные пептиды

ЛПС (LPS) – липополисахарид

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОП600 – оптическая плотность, измеряемая при $\lambda=600$ нм

ПААГ – полиакриламидный гель

ПГ – пептидогликан

ПГГ – пептидогликангидролазы

ПСД – деполимеразы полисахаридов

УЗ – ультразвуковой

ЭФ – электрофорез

АТСС – American Type Culture Collection

СВД – домен связывания с клеточной стенкой (cell-wall binding domain)

SAR – сигнальный домен встраивания в мембрану (Signal-Arrest-Release)

TAL – лизины хвостовых отростков бактериофагов

VARGHs – вирион-ассоциированные пептидогликангидролазы

М – остаток β -D-маннуриновой кислоты

Г – остаток α -L-гулуриновой кислоты

TRP³⁻ – триполифосфат

Глава 1. Введение

Инфекции кожи и мягких тканей (ИКМТ) занимают важное место среди клинических нозологий. В эту группу входят внебольничные инфекции, развивающиеся в результате микро- и макротравм, инфекции, связанные с инвазивными диагностическими и терапевтическими процедурами, а также оппортунистические инфекции, связанные с нормальной микробиотой пациента. К ним относятся инфекция области хирургического вмешательства, синдром диабетической стопы, инфицированные трофические язвы, инфицированные ожоговые раны и другие, также ИКМТ занимают третье место по частоте в этиологической структуре сепсиса. Это во многом связано с важнейшей ролью кожи как самого большого органа тела, состоящего из эпидермиса, дермы и подкожных тканей, служащего основным барьером против воздействий окружающей среды и обладающего среди других органов одним из наиболее высоких регенеративных потенциалов (наряду с печенью и слизистой желудочно-кишечного тракта) (Blackburn et al., 2025).

Основная цель лечения ран – остановить кровотечение, предотвратить инфицирование и способствовать заживлению. При первичном натяжении края раны сближаются и удерживаются с помощью швов, кожного клея, скоб, пластырей и т.д. Поскольку значительной потери объема тканей не происходит, а риск инфицирования низкий, такие раны обычно заживают быстро, в течение 4–21 дня, с минимальным образованием рубцов. Однако когда сближение краёв раны невозможно обеспечить из-за большого объёма потери тканей, заживление происходит вторичным натяжением. Раны, заживающие вторичным натяжением, заполняются грануляционной тканью, которая представляет собой сложную комбинацию новообразованных капилляров, клеток и коллагеновых волокон. Заживление вторичным натяжением требует гораздо больше времени и приводит к образованию рубцов (Williams et al., 2023).

Повреждение эпидермиса и дермы, а также повреждение более глубоких слоев кожи создаёт потенциальный риск инфицирования как через

проникновение инфекционных микроорганизмов, так и в результате кровопотери. Риск инфицирования связан со сложным процессом заживления ран и ожогов, особенно происходящим путем вторичного натяжения, который состоит из 4-х стадий, обычно перекрывающимися и влияющими друг на друга. Эти стадии включают 1) гемостаз, 2) воспаление, 3) пролиферацию и 4) регенерацию; на каждой стадии задействованы различные клетки и биоактивные молекулы (рис. 1).

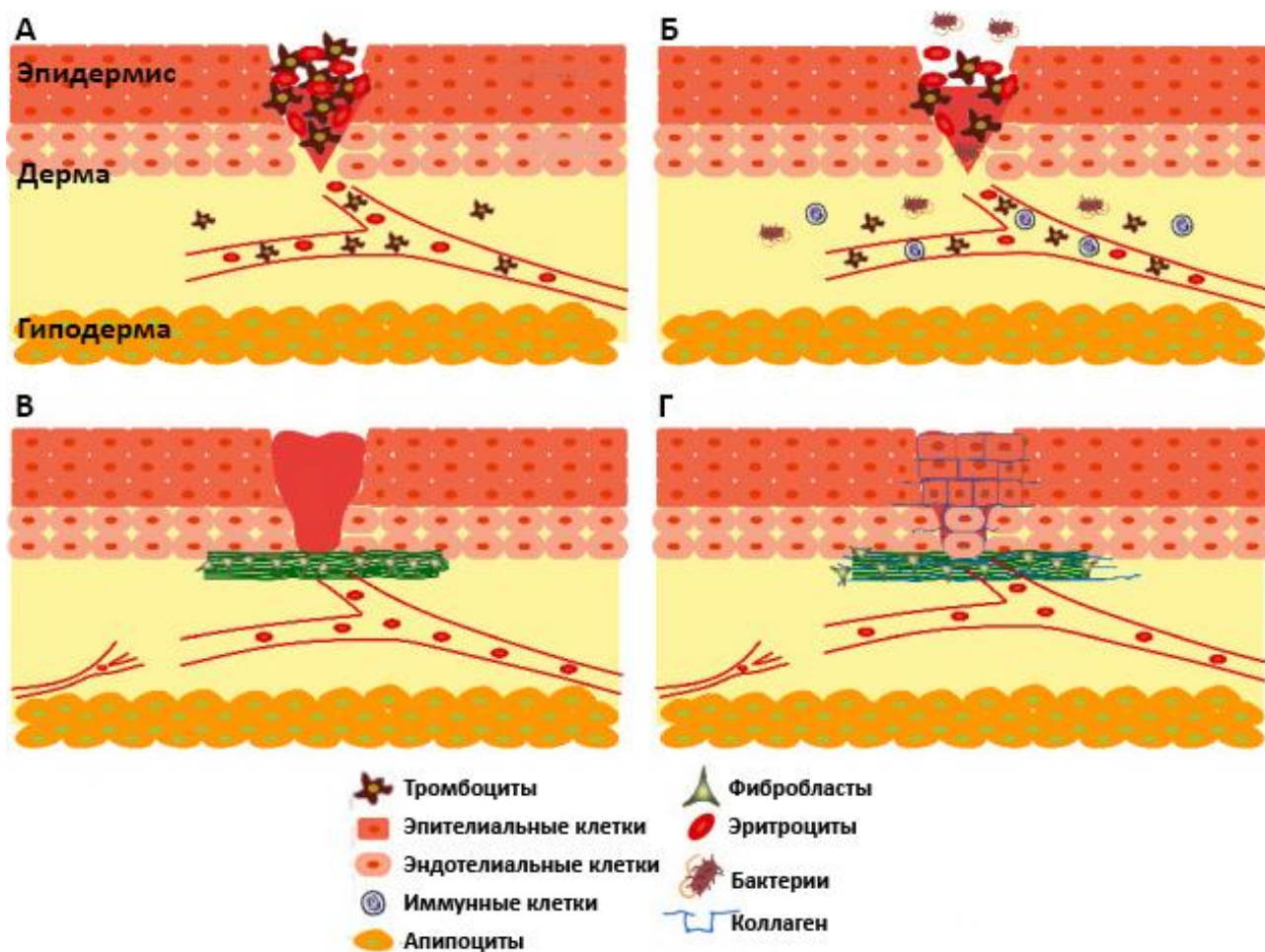


Рисунок 1. Общая схема процесса заживления раны: А - стадия гемостаза, Б - стадия воспаления, В - стадия пролиферации и Г - стадия регенерации.

Стадия гемостаза, известная также как эксудативная и коагуляционная, начинается сразу после повреждения, и приводит к остановке кровотечения из кровяных сосудов. Кроме того, клеточная сигнализация посредством секреции цитокинов и различных факторов роста вызывает миграцию фибробластов, эндотелиальных клеток, иммунных клеток и клеток-

предшественников к месту повреждения. Ангиогенез, вазоконстрикция и образование тромба способствуют достижению остановки кровотечения на этой стадии, что также влияет на последующие этапы заживления раны (рис. 1А).

Воспалительная стадия обычно длится до 72 часов после травмы, а тромбоциты стимулируют высвобождение медиаторов воспаления из тучных клеток и базофилов, что приводит к развитию воспаления, повышению температуры и вазодилатации. Кроме того, тромбоциты стимулируют миграцию иммунных клеток к месту повреждения кожи, высвобождая комплекс факторов роста, участвующих в очистке от патогенных микроорганизмов и удалении нежизнеспособных клеток (рис. 1Б).

Пролиферативная стадия начинается на четвертый день процесса заживления и может длиться до 21 дня в зависимости от состояния пациента, размера и типа раны. Помимо ангиогенеза, на этой стадии происходят пролиферация клеток и синтез эластина, а грануляционная ткань заменяет тромб, образовавшийся в пораженном месте. Кроме того, сокращение раны осуществляется за счёт дифференцировки фибробластов в миофибробласты, что приводит к формированию границы между здоровой и поврежденной областями (рис. 1В).

Стадия регенерации представляет собой скоординированный процесс формирования новых тканей и разрушения поврежденной ткани и может длиться до одного года или даже дольше. Кроме того, коллагеновые волокна участвуют в образовании рубца, что приводит к закрытию раны и укреплению кожи в месте повреждения. Помимо восстановления полноценной соединительной ткани и эпителиального слоя на этой стадии, процесс апоптоза уничтожает ненужные клетки в области регенерации (рис. 1Г) (Nemmati et al., 2023).

ИКМТ нарушают нормальную последовательность этих этапов, препятствуя заживлению кожных ран и повышая частоту осложнений (Dinić M. et al., 2024). Такие инфекции обычно характеризуются полимикробной мультирезистентной микрофлорой и сопровождаются развитием некрозов и глубоким проникновением инфекции. Наиболее частыми возбудителями среди

грамотрицательных бактерий являются *Pseudomonas aeruginosa* и энтеробактерии (прежде всего *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*), устойчивые к цефалоспорином и карбапенемам, среди грамположительных бактерий это чаще всего *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis*, в особенности метициллин-резистентные штаммы. При этом, рост антибиотикорезистентных штаммов грамотрицательной и грамположительной флоры вызывает значительные трудности в лечении таких инфекций и негативно влияет на клинические результаты и при ИКМТ. Помимо смерти и осложнений, затяжное течение болезней приводит к удлинению сроков госпитализации пациентов, а снижение эффективности существующих противомикробных средств требует применения агрессивных схем лечения с максимально возрастающими дозами антибиотиков, длительными курсами, комбинациями из нескольких видов антибиотиков, различных механизмов действия. Ещё одним отягчающим фактором при развитии таких типов инфекций является формирование бактериальных пленок, где значительно затруднена способность антибиотиков проникать и действовать на бактериальные клетки. Следовательно, лечение инфекций, склонных к образованию биопленок (в том числе, раневых инфекций), требует увеличения доз антибиотиков и пересмотра схем их введения. Это увеличивает нагрузку на систему здравоохранения и приводит к значительному увеличению затрат на лечение больных с ИКМТ (Blackburn et al., 2025; Nemmati et al., 2023).

Востребованность новых стратегий лечения бактериальных инфекций также растет по мере распространения во всем мире приобретенной устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. Устойчивость бактерий к существующим противомикробным средствам является одной из основных проблем современности в области здравоохранения. Всемирная организация здравоохранения обращает особое внимание на грамотрицательные патогены группы ESKAPE, такие как *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и другие представители *Enterobacteriaceae*, которые способны приобретать устойчивость

сразу к нескольким антибактериальным препаратам или их классам, и чаще других вызывают опасные для жизни пациентов инфекции, включая тяжелые внутрибольничные системные и местные инфекции. В частности, сложная картина инфицирования полимикробными консорциумами, включающими грамотрицательные патогены, характерна для осложненных ИКМТ, сопровождающихся развитием некрозов и глубоким проникновением инфекции, а также при хронических раневых инфекциях, развивающихся на фоне трофических нарушений. При этом решающую роль в развитии ИКМТ играет антибактериальная резистентность (АБР) микроорганизмов, уровень которой в стационарах с интенсивным использованием антибиотиков с каждым годом растет, и, как следствие, снижается эффективность терапии с использованием традиционных антибиотиков. Например, существует острая потребность в эффективных препаратах для лечения карбапенем-резистентных и цефалоспорин-резистентных грамотрицательных бактериальных инфекций, а также инфекций с полимикробной этиологией (Blackburn et al., 2025).

Таким образом, решающую роль в успешности лечения ИКМТ играет своевременная и эффективная местная антибактериальная терапия, учитывающая вероятный спектр резистентности возбудителей. В связи с этим актуальным является направление создания новых раневых повязок и покрытий (wound covering/dressing), способных нести и дозированно высвобождать инкапсулированные в них противомикробные лекарственные средства для местного применения, демонстрирующие минимальный риск появления новых резистентных штаммов и не теряющих свою эффективность при длительной или курсовой терапии (Cristea Hohotă et al., 2025).

Данная тематика очень востребована в современной регенеративной медицине и активно развивается, о чем свидетельствует практически экспоненциальный рост числа научных статей в последнюю четверть века (рис. 2), т.е. с 2000 г., когда началось активное исследование в этой области.

Date published



Reset

Go to results

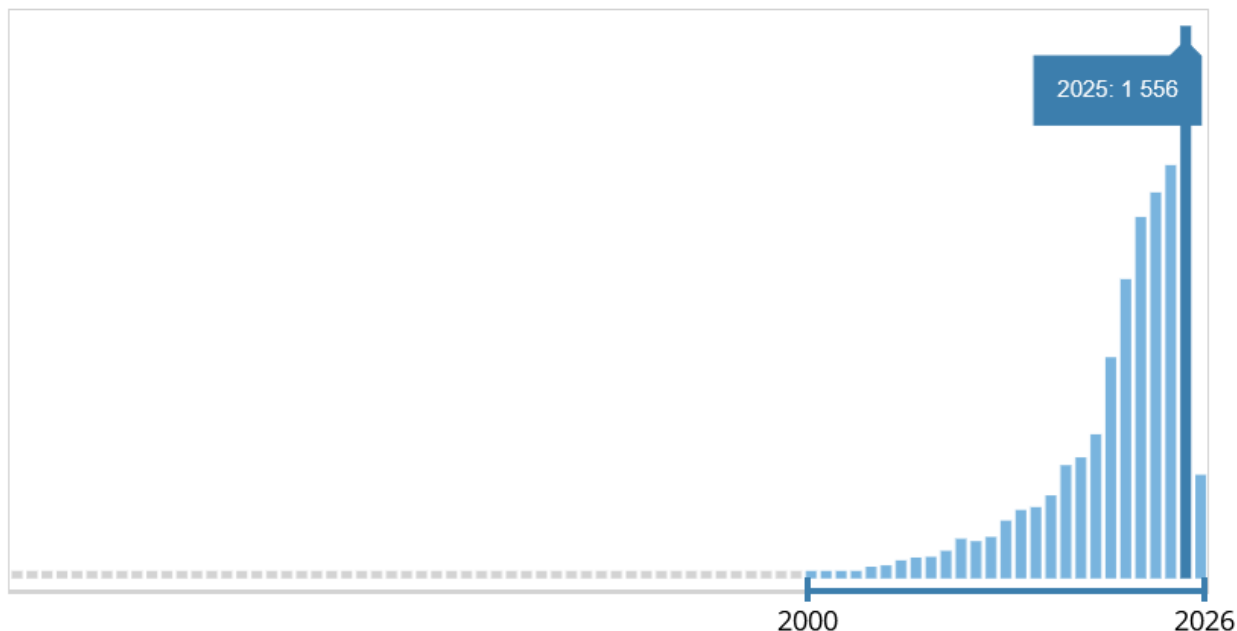


Рисунок 2. Рост числа научных публикаций с 2000 по 2026 гг. в библиографической базе Europe PMC (PubMed) (<https://europepmc.org>) по тематике исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами (поисковый запрос «wound AND (dressing OR covering) AND (antimicrobial OR antibacterial) AND antibiotic AND resistance», копия графика с сайта Europe PMC, всего – 9308 публикаций).

Анализ по ключевым словам этой базы данных из 9,3 тыс. научных статей с помощью программы VOSviewer (Bukar et al., 2023) выявляет довольно яркую картину разбиения этой тематики на три больших кластера: 1) медицина (проблематика лечения ран); 2) микробиология и генетика (проблематика – антибиотикорезистентные микроорганизмы); 3) медицинская химия, материалы и технология (проблематика биосовместимых материалов и лекарственных веществ для разработки раневых покрытий) (рис. 3). Причем тематики

исследования лекарственных веществ, медицинских материалов и технологий наиболее новые.

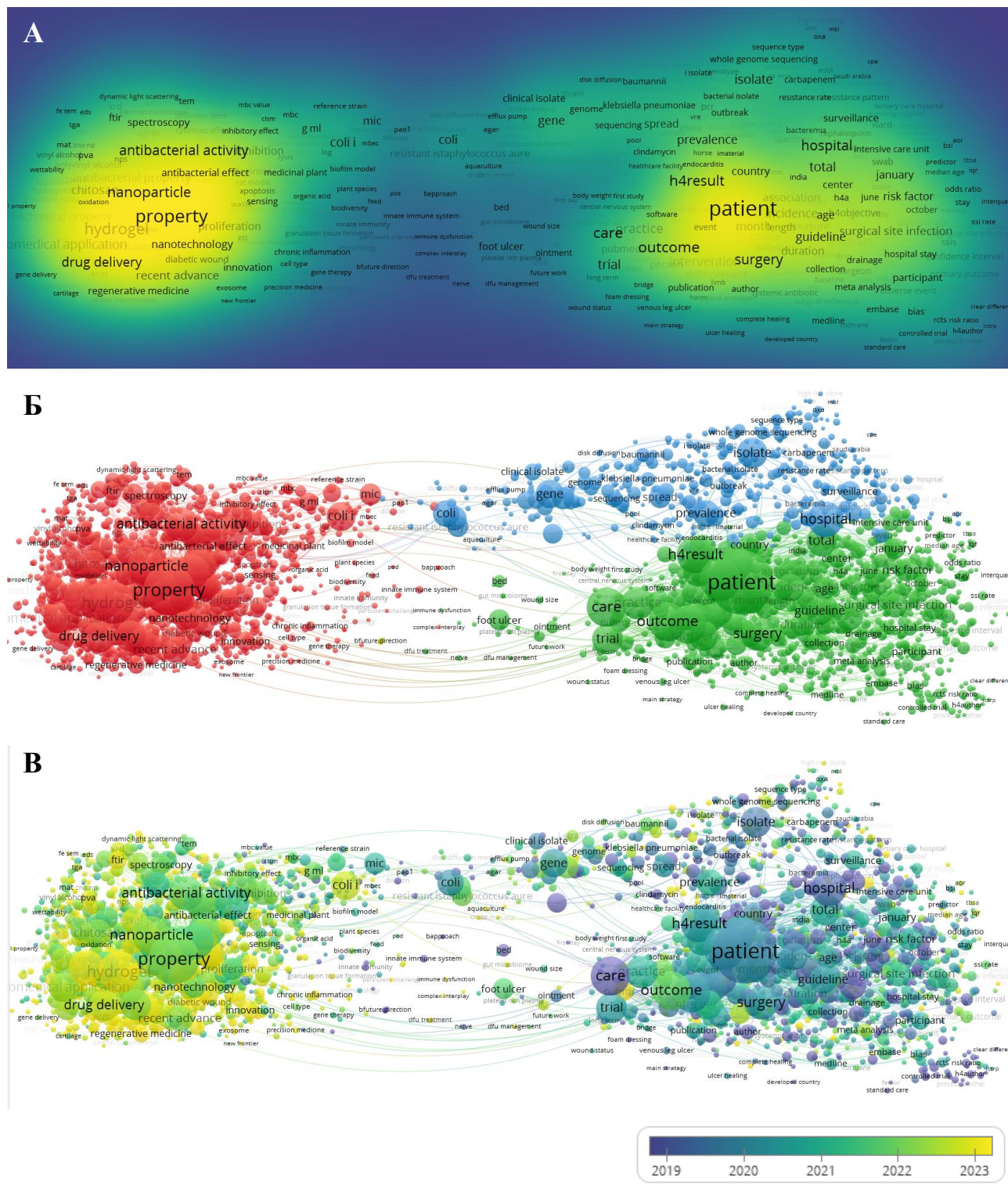


Рисунок 3. Анализ тематики исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами (поисковый запрос «wound AND (dressing OR covering) AND (antimicrobial OR antibacterial) AND antibiotic AND resistance», всего – 9308

публикаций) в библиографической базе Europe PMC (PubMed) (<https://europepmc.org>) по ключевым словам с помощью программы VOSviewer (Центр исследований науки и технологий (CWTS), Лейденский университет, Нидерланды). А – общая плотность частотности использования терминов, Б – частотность употребления (диаметр круга) и связи (линии) ключевых слов (терминов) 3-х основных кластеров: 1) медицина (зеленый); 2) микробиология и генетика (голубой); 3) медицинская химия, материалы и технология (красный).

Можно также проанализировать связи между отдельными наиболее важными терминами в рамках этой тематики (рис. 4). Так, термин «гидрогель» связан со следующими терминами: «высвобождение лекарств», «антибактериальная активность», «наночастицы», «хитозан», «ангиогенез», «E. coli», «биомедицинское использование», «уход», «исход» (лечения), «пациент» (рис. 4А). Термин «изолировать»/«изолят» связан с терминами: «ген», «полногеномное секвенирование», «тип секвенирования», «распространение», «распространенность» (заболевания), (эпидемиологический) «надзор», «E. coli», «больница», «пациент» (рис. 4Б). Термин «инфекция операционной области» связан с терминами: «фактор риска», «хирургия», «уход», «исход» (лечения), «результат», «заболеваемость», «продолжительность» (лечения), «методические рекомендации», «больница», «пациент» (рис. 4В).

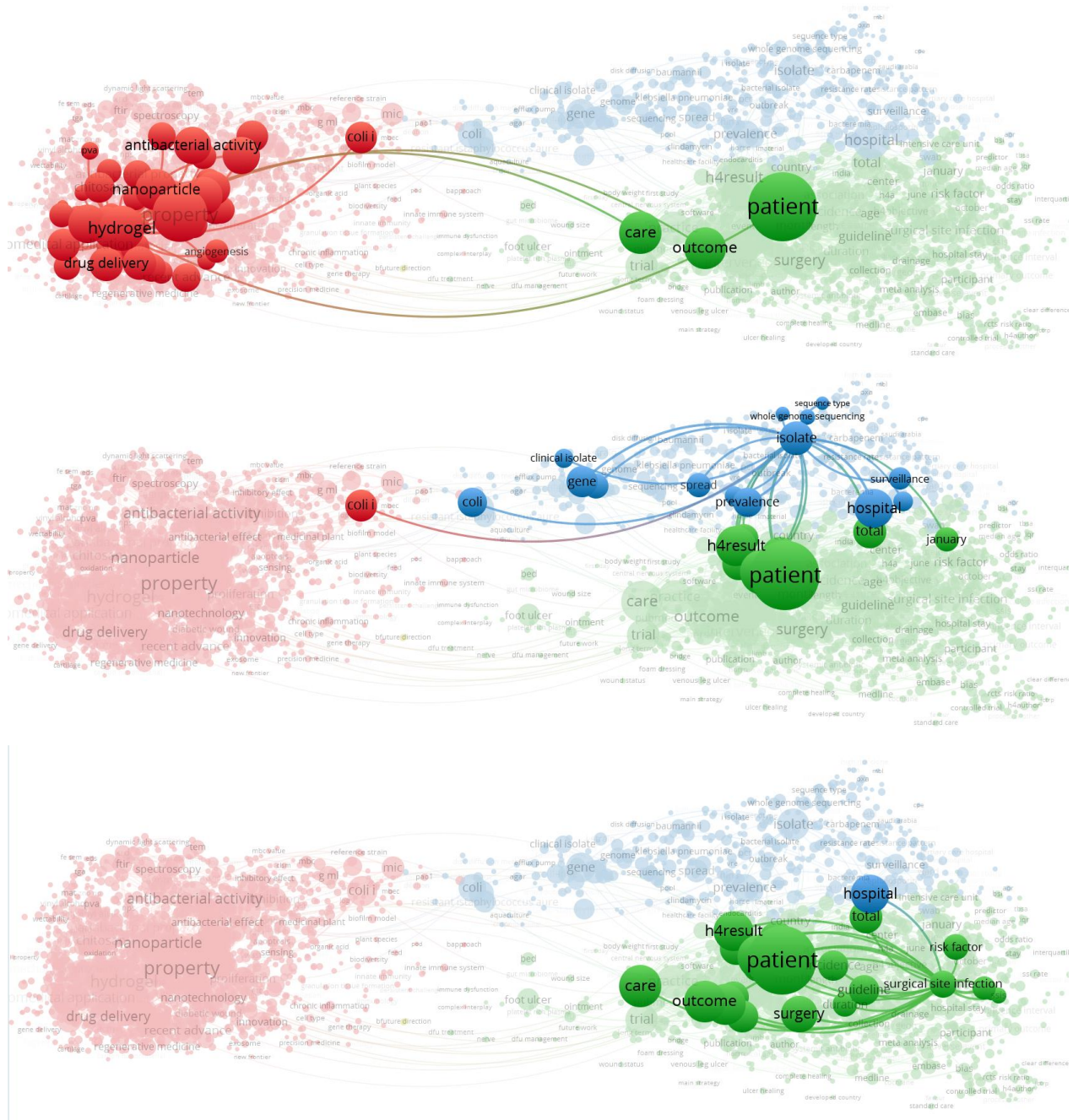


Рисунок 4. Анализ взаимосвязи отдельных терминов внутри тематики исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами (поисковый запрос «wound AND (dressing OR covering) AND (antimicrobial OR antibacterial) AND antibiotic AND resistance», всего – 9308 публикаций) в библиографической базе Europe PMC (PubMed) (<https://europepmc.org>) по ключевым словам при помощи программы VOSviewer (Центр исследований науки и технологий (CWTS), Лейденский университет, Нидерланды). А – общая плотность частотности использования терминов, Б – частотность употребления (диаметр

круга) и связи (линии) ключевых слов (терминов) 3-х основных кластеров: 1) связи термина «гидрогель» с другими терминами; 2) связи термина «изолировать»/«изолят» с другими терминами; 3) связи термина «инфекция операционной области» с другими терминами.

Анализ тематики с помощью программы PubMed PubReMiner (<https://hgserver2.amc.nl/cgi-bin/miner/miner2.cgi>) показывает, что среди антибактериальных действующих веществ наиболее активно исследуются для введения в раневые покрытия и повязки следующие биологически-активные вещества: частицы металлов и углеродные материалы (серебра, меди, золота, графита, металлоорганические каркасы, графена оксид), антибиотики (ципрофлоксацин, ванкомицин, гентамицин), антиоксиданты (индолы, полидофамин), фотосенсибилизаторы, антибактериальные пептиды, растительные экстракты, литические ферменты, бактериофаги. В исследованиях для изготовления раневых покрытий и повязок чаще всего используют материалы из природных полимеров (хитозана, альгината, целлюлозы, желатина, полиэфиров, гиалуроновой кислоты, коллагена, карбоксиметилцеллюлозы) и синтетических полимеров (поливинилового спирта, полиэтиленгликоля).

Анализ корпуса текстов 34-х обзоров по данной тематике за последние 5 лет (2021-2026 гг.), имеющих в свободном доступе, с помощью программы анализа текстов Voyant Tools (Gregory et al., 2022) в целом подтвердило показанную выше взаимосвязь основных терминов («wound», «dressing»/«covering» и «antimicrobial»/«antibacterial») с различными терминами в медицине («treatment», «infection», «drug», «antibiotic», «inflammation», «ulcers», «lysozyme» и др.) микробиологии («aureus», «aeruginosa», «resistance», «phage» и др.), химии и материаловедении («hydrogel», «polymers», «metal», «nanoparticles», «composite» и др.) (рис. 5).

тематике исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами (поисковый запрос «wound AND (dressing OR covering) AND (antimicrobial OR antibacterial) AND antibiotic AND resistance», всего – 9308 публикаций) в библиографической базе PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), созданные в программе Voyant Tools (разработана Stéfan Sinclair (Университет Макгилла, Канада) and Geoffrey Rockwell (Университет Альберты, Канада)), <https://voyant-tools.org/?corpus=174913cf25e466c397d00bbb03f0f016> (Gregory et al., 2022).

Анализ взаимосвязи научных групп, работающих по этому направлению, с помощью программы VOSviewer (Bukar et al., 2023) показывает, что в этой области имеется 101 активная научная группа, объединенная через соавторство, из которых можно выделить 7 наиболее крупных – насчитывающих от 28 до 67 исследователей (рис. 6).

Наиболее активными и крупными являются научные группы, возглавляемые проф. Alexandru Mihai Grumezescu из Университета Бухареста (Румыния) (Alberts et al., 2025), проф. Jingwei Xie из университета Небраски (США) (Wang et al., 2024), проф. Irena Pastar из Школы Медицины Миллера Университета Майами (США) (Dinić et al., 2024), проф. Lona Mody из медицинского центра в Анн-Арборе Мичиганского университета (США) (Heinze et al., 2019), проф. Michael Hamblin из университета Йоханесбурга (Южная Африка) (Alipoor et al., 2022), проф. Jean-Paul Pirnay из Военного Госпиталя Королевы Астрид в Брюсселе (Бельгия) (Verbeken et al., 2025), проф. Ying Wang из Столичного Медицинского университета в Пекине (Китай) (Yue et al., 2025) и другие (рисунок 6). Наиболее активно исследования в этой области проводятся согласно анализу PubMed PubReMiner в следующих странах (по убыванию числа публикаций в базе PubMed): Китай, США, Великобритания, Индия, Иран, Египет, Италия, Канада, Польша, Австралия и других.

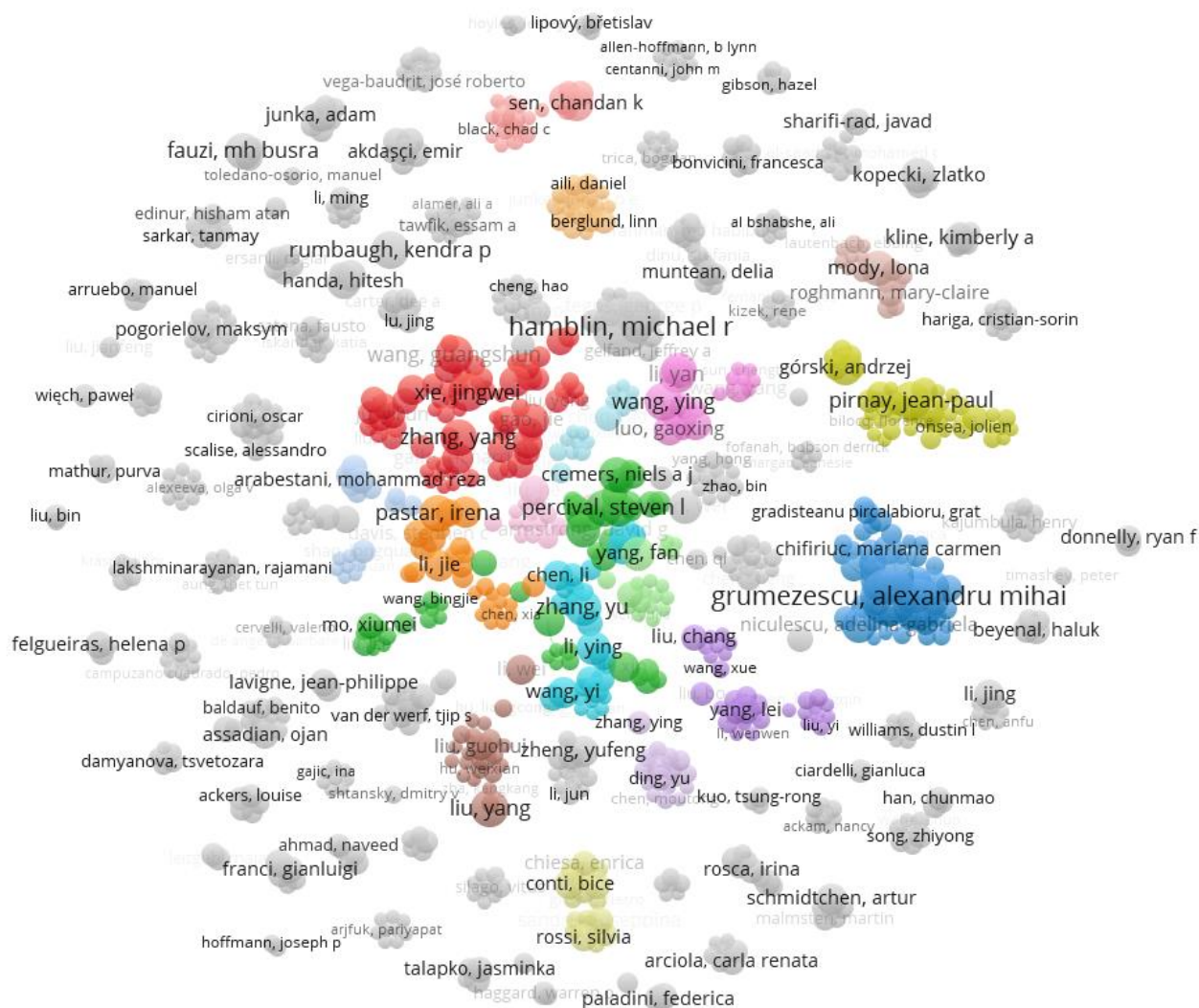


Рисунок 6. Анализ взаимосвязи ключевых исследователей (авторов научных статей) и научных групп под их руководством, работающих по тематике исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами (поисковый запрос «wound AND (dressing OR covering) AND (antimicrobial OR antibacterial) AND antibiotic AND resistance», всего – 9308 публикаций) в библиографической базе Europe PMC (PubMed) (<https://europepmc.org>) по ключевым словам при помощи программы VOSviewer (Центр исследований науки и технологий (CWTS), Лейденский университет, Нидерланды).

Таким образом, тематика исследования и применения раневых повязок и покрытий для лечения ран, инфицированных антибиотикорезистентными микроорганизмами, носит ярко выраженный междисциплинарный характер и объединяет исследователей с разных континентов и из разных научных областей: химии, материаловедения, биохимии, молекулярной биологии, генетики, микробиологии, вирусологии, медицины и фармакологии. Кроме того, данная тематика тесно связана с биоинженерией и биотехнологией, имеет прикладной характер и направлена на разработку новых медицинских изделий и лекарственных препаратов. Такая междисциплинарно-инженерная специфика этой тематики была максимально учтена нами при составлении материала первой фундаментально-теоретической части и разработке задач Практикума «Исследование формирования и свойств альгинатного гидрогеля для доставки бактериолитических ферментов, используемых для лечения инфицированных ран» 2-ой части настоящего учебно-методического пособия.

Пособие предназначено для студентов и аспирантов университетов, медицинских и сельскохозяйственных ВУЗов, специализирующихся в областях биотехнологии, биоинженерии, молекулярной биологии, биохимии, вирусологии, клеточной биологии, медицины, фармакологии, ветеринарии. Эта книга может быть использована преподавателями биологических факультетов университетов и быть полезна для специалистов, нуждающихся в освоении описанных экспериментальных методов.

Глава 2. Новые антибактериальные средства и системы их доставки для лечения инфицированных ран

2.1. История создания материалов раневых повязок и лекарственных средств для лечения ран и ожогов

Люди древних цивилизаций уже в некоторой степени понимали процесс заживления ран и ожогов и необходимости использования для ускорения процессов заживления различных биологически активных веществ и материалов, в т.ч. обладающих антибактериальными свойствами и препятствующих развитию ИКМТ.

Первые свидетельства о знаниях древних людей в этой области относятся к возможному использованию неандертальцами березового дёгтя, которое было предположено в недавней работе Siemssen et al. березовый дёготь хорошо известен как клей, использовавшийся в среднем палеолите Европы, в т.ч. неандертальцами. Авторы показали, что дёготь, изготовленный из коры *Betula pendula* и *Betula pubescens* с помощью методов подземной ямы и конденсации, доступных неандертальцам, обладал умеренным действием против грамположительного *S. aureus*, широко известного своей ролью в инфицировании ран. Антибиотические свойства, показанные в этом исследовании, согласуются с использованием березового дёгтя в качестве раневой повязки и кожной мази (рис. 7) в общинах микмак в Восточной Канаде и с использованием березового дёгтя в общинах саами в Лапландии (Siemssen et al., 2026). Интересно, что березовый дёготь содержит бетулиновый альдегид и бетулиновую кислоту, для которых была показана активность против антибиотикорезистентных бактерий, таких как метициллин-резистентный золотистый стафилококк (MRSA) (Chung et al., 2022). Следует отметить, что один из наиболее популярных препаратов в СССР для лечения ран и ожогов - линимент бальзамический по Вишневскому, разработанный в 1927 г. советским хирургом А.В. Вишневским, также содержал березовый дёготь. Однако необходимо отметить и критику этого препарата в медицинском и научном

сообществе из-за ряда осложнений, которое он был способен вызывать, в т.ч. благодаря местнораздражающему действию дёгтя (Яргин, 2015).



Рисунок 7. Тонкий слой вязкого березового дёгтя, полученного по доступной в палеолите технологии, нанесённый на белую поверхность. Примерно 0,2 г березового дегтя достаточно, чтобы покрыть около 100 см² поверхности кожи (адаптировано из Siemssen et al., 2026).

Древние египтяне верили, что открытая рана может служить возможным входом для злых существ, и чтобы предотвратить такую возможность, они использовали для заполнения ран ослиными экскрементами. Интересно, что т.к. фекалии содержат антибиотические вещества, а также такие белки, как трипсин, они могли способствовать заживлению (Papi & Fiscarelli, 2025).

Однако египтяне также понимали, что воспаление и инфицирование вредят заживлению, и использовали заплесневевший хлеб (который, как известно, содержит пенициллин), а также мёд и сахар. Медовая или сахарная мазь (успокаивающая) улучшала заживление и уменьшала загрязнение поверхности раны (Gottrup and Leaper, 2004).

Гиппократ (460–370 гг. до н. э.) рекомендовал использовать вино или уксус для очищения ран, а затем наносить мёд, масло и вино. В Древней Греции перевязки ран практиковались ещё со времен Микенской цивилизации (рис. 8) (Pari & Fiscarelli, 2025).



Рисунок 8. Ахилл перевязывает раненого Патрокла. Сюжет из Илиады с античной чаши (фрагмент), IV в. до н.э.

Египтяне также использовали марлю, пропитанную жиром, в качестве повязок. Марлю использовали и в древнем Китае. Гален (131–201 гг. н. э.), древнеримский хирург гладиаторов в Пергаме, также полагался на такие материалы, как марля для перевязок. Марля как перевязочный материал прочно утвердилась к V веку до н. э. Марлю часто называют абсорбирующей (впитывающей) марлей, и её не следует путать с нетканой марлей, которая обычно изготавливается из смеси вискозы или синтетических материалов. Нетканые марли были введены для замены абсорбирующей марли, поскольку они меньше прилипают к раневому ложу и с меньшей вероятностью оставляют волокна в ране. Тем не менее, абсорбирующая марля до сих пор широко

используется во всём мире (Jones, 2015). Относительно практической части учебно-методического пособия, некоторые виды марли тоже можно использовать в качестве поддерживающего материала для нанесения альгинатного гидрогеля.

Проблему прилипания повязок к ране впервые осознал и впоследствии решил пионер кинематографа (вместе со своим братом Луи) Огюст Люмьер (1862–1954) во время Первой мировой войны. Люмьер разработал низкоадгезивную повязку под названием «tulle gras» («масляный тюль» – парафиновая марля). Изначально повязка состояла из ткани редкого плетения, покрытой мягким парафином и 1,25% перуанского бальзама в качестве мягкого антисептика. Однако у некоторых пациентов возникала кожная реакция, поэтому в конечном итоге перуанский бальзам был исключён из состава (Jones, 2015).

Во время Второй мировой войны капитан Х. Блум, член Королевского армейского медицинского корпуса, попал в плен в Италии. Там он ухаживал за сослуживцами, которые страдали от ожоговых ран. Вместо использования tulle gras он применял целлофан, который извлекал из расходных материалов для переливания крови и затем стерилизовал паром. Блум обнаружил, что ожоговые раны, обработанные таким способом, заживали хорошо, и пациенты отмечали, что боль исчезала сразу после наложения плёнки. Он также заметил, что раны заживали под тонким слоем сыворотки и что повязка была проницаема для воды (Bloom, 1945; Jones, 2015).

В 1962 году Джордж Уинтер опубликовал свою теорию влажного заживления ран, которая показала, что эпителиальные клетки мигрируют по раневому ложу быстрее во влажной среде по сравнению с сухой (Winter, 1962). До публикации работы Уинтера абсорбирующая марля считалась повязкой выбора и использовалась для большинства ран. Ленточная марля пропитывалась такими веществами, как эвзол, профлавин и хлоргексидин, и использовалась для тугого тампонирования свищевых ходов. Теория заключалась в том, что это будет удерживать края раны разведёнными и способствовать грануляции раны

снизу вверх, но эта теория так и не была подтверждена, а применение этих антибиотиков впоследствии сочли потенциально цитотоксичным (Jones, 2015).

Однако теория влажного заживления ран в конечном итоге привела к разработке нового поколения раневых повязок с появлением гидроколлоидной повязки в 1980-х годах. Гидроколлоид при контакте с раневым экссудатом способствует тому, что полисахариды и другие полимеры впитывают воду и набухают, образуя гель. Это стало началом новой волны разработки раневых повязок в последующие более чем 30 лет (Jones, 2015).

2.2. Обзор современных раневых покрытий и повязок, содержащих и высвобождающих антибактериальные лекарственные вещества

Интерес к новым технологиям создания биосовместимых материалов для разработки и производства раневых и ожоговых повязок и покрытий постоянно растет. Это связано с интенсивным развитием в последнее время инженерных и технологических направлений в биологии и медицине: тканевой инженерии и биофармацевтики.

Лекарственные формы и медицинские изделия для местного применения должны отвечать ряду специфических требований. Для лечения раневых и ожоговых ИКМТ предпочтительными являются мягкие формы на водорастворимой основе, а не липофильные мази или растворы антисептиков, обладающие подходящими реологическими свойствами и способствующие оттоку некротических тканей. В национальных рекомендациях по лечению хирургических инфекций кожи и мягких тканей для лечения язв и хронических ран рекомендуется использовать различные виды перевязочных средств, гелей и матриц (Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские Национальные рекомендации, 2015).

В настоящее время для получения раневых повязок и покрытий используются полимеры, выделенные из растительного и животного сырья, или полученные путем химического синтеза из нефтепродуктов. Разрабатываются и уже активно используются в медицинской практике целый ряд природных и синтетических полимеров: полиэферы оксикарбоновых кислот, полиангидриды,

полиалкилцианоакрилаты, полифосфазены, полифосфоэфиры, полиортоэфиры, некоторые полисахариды (хитозан, гиалуроновая кислота, агароза, декстран, альгинаты, хондроитинсульфат) и белки (коллаген, фибрин, фиброин шелка, желатин). Вместе с тем, с накоплением клинического опыта их применения происходит ужесточение требований к существующим полимерным материалам биомедицинского назначения. Согласно современным требованиям полимерные биоматериалы должны обладать необходимым сочетанием биологических (биосовместимость, биodeградируемость, неиммуногенность, тромборезистентность) и физико-химических (механических, диффузионных, термических, кристалличность, гидрофильность и др.) свойств. Особенно актуальным такое сочетание биологических и физико-химических свойств необходимо для разработки высокотехнологичных медицинских изделий и лекарственных форм. Полимерный материал для создания таких изделий должен обладать оптимальным сочетанием самых разнообразных свойств: биodeградируемостью с определенной скоростью, биосовместимостью, хорошими механическими свойствами и способностью к обработке различными методами (экструзией, формованием из расплава и раствора, лазерной резкой и др.). В последние два десятилетия активно развивается тканевая инженерия - биомедицинская технология, которая, благодаря совместному использованию живых клеток, биоматериалов и биоактивных веществ, таких как низкомолекулярные лекарственные вещества, факторы роста, гормоны, цитокины, генетические конструкции, позволяет осуществлять регенерацию тканей, поврежденных в результате травм и заболеваний. Разработка биомиметических материалов для воссоздания микросреды живой ткани, обладающих ее основными характеристиками, является одним из наиболее перспективных направлений в тканевой инженерии и регенеративной медицине (Cristea Nohotă et al., 2025).

Гели и гидрогели на основе водорастворимых биополимеров, таких как альгинаты и другие полисахариды, обладают хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью, способностью к молекулярному связыванию и активно

исследуются для биомедицинских приложений, таких как доставка лекарств, получение медицинских имплантатов, в тканевой инженерии. Кроме того, форма геля наиболее удобна из-за структуры трехмерного полимерного каркаса, который структурно схож с естественным внеклеточным матриксом. Такие гидрогели хорошо высвобождают гидрофильные действующие вещества, способны обеспечивать хорошее распределение по раневой поверхности и прикрепление к ней, не нарушают газообмен, в их состав можно ввести вещества, способствующие оттоку экссудата, просты в нанесении и при необходимости легко удаляются с места нанесения (Ahmed et al., 2025).

Однако выделение полимеров из растительного или животного сырья не позволяет получать медицинские изделия с заданными характеристиками для биомедицинского применения вне зависимости от условий окружающей среды, а синтетические полимеры часто не обладают способностью к биодegradации и обладают недостаточно хорошей биосовместимостью. Поэтому активно развиваются биотехнологические подходы для синтеза природных полимеров: полисахаридов, полиоксиалканоатов, белков и других. Преимущества биотехнологических процессов очевидны - экологическая безопасность и возможность направленного синтеза. Использование направленного синтеза для получения целевых продуктов с помощью микробных продуцентов для нужд медицины позволяет создавать материалы с необходимыми, а также совершенно новыми свойствами для целей трансплантации органов и тканей, регенеративной медицины, создания лекарственных средств для лечения заболеваний различной этиологии, а также косметологии и пищевой промышленности. Выработанные на данный момент требования к применяемым в медицинской биоинженерии материалам, заставляют исследователей постоянно искать новые полимеры и их источники, удовлетворяющие требованиям производства. Материалы на основе полимеров бактериального, растительного и грибкового происхождения, такие как альгинаты, полиоксиалканоаты, хитозан и др., и их комбинаций, обладают биосовместимостью, низкой токсичностью, при этом позволяют добиться

механической прочности и эластичности материала (Hernández-Arriaga et al., 2022).

Альгинаты (АЛГ) с высокой молекулярной массой могут создавать обширные трехмерные ионные сети из связей гулуранов с кальцием. За счёт таких сетей возможно разрабатывать плотные альгинатные гидрогели, которые могут быть применены в качестве скаффолдов для тканевой инженерии (Lee et al., 2001), носителей лекарственных средств (Qiu et al., 2001) и в качестве внеклеточных матриц (Discher et al., 2009; Sun et al., 2012). Помимо молекулярной массы на физико-химические свойства может влиять и мономерный состав альгината. Именно гелеобразование при помощи механизма ионотропного взаимодействия с ионами металлов делает альгинат привлекательным для широкого спектра применения в биомедицине. Молекулярная масса АЛГ важна при формировании гидрогеля АЛГ для доставки лекарственных веществ, ферментов или белков (Lee et al., 2012). Для формирования матриц из АЛГ для тканевой инженерии рекомендуется использовать полимеры с высокой молекулярной массой, так как, возможно, полимер будет подвержен изменениям рН, что может повлиять на его характеристики (Sun et al., 2013). Недавно было показано (Fischer et al., 2017; Noefer et al., 2015), что высокоочищенный АЛГ, полученный с помощью *A. vinelandii*, из которого сделали волокна, обладает большей способностью к формированию гелей, чем АЛГ, полученный из водорослей. Наличие ацетилирования у бактериального АЛГ и его активная способность к гелеобразованию позволяет успешно использовать его в качестве раневых покрытий (Fischer et al., 2017). Однако биосовместимость бактериального АЛГ и влияние ацетилирования на рост культур тканей животных клеток не изучено. В настоящее время среди медицинских изделий на основе альгината самое широкое применение получили перевязочные материалы. Использование АЛГ в качестве материала для раневых покрытий сейчас активно исследуется. Кожа сама по себе постоянно регенерирует, однако при воздействии кислот или при сильных ожогах её восстановление может быть не таким успешным, как

хотелось бы. Для того, чтобы уменьшить время восстановления и облегчить заживление поверхности раны возможно использование покрытий из различных материалов (Юданова, Решетов, 2006). АЛГ выгодно отличается тем, что, во-первых, может функционировать как защита поверхности раны от микробных воздействий. Во-вторых, служить подложкой под клетки, давая им возможность закрепиться и уменьшить таким образом неровность заживления. Было проведено сравнение раневых повязок, полученных из тонких нитей АЛГ водорослевого и бактериального. Нити альгината кальция из бактериального альгината натрия формируются более тонкие, чем из водорослевого, однако прочность их достаточная для формирования тканевого полотна. Было показано, что раневые повязки из нитей бактериального АЛГ при водопоглощении лучше формируют гидрогель, он более однородный, аморфный, не видны нити, водопоглощение раневых повязок из бактериального АЛГ в два раза выше, чем у водорослевых АЛГ. Таким образом, такие повязки лучше снимаются с раневых поверхностей, снижая повреждение тканей за счёт лучшего растворения при снятии с помощью хлористого натрия (Hoefel и др., 2015). Также важна возможность контролируемого желирования альгината. Добавление глюколактона с ионами кальция обеспечивает постепенное высвобождение ионов кальция при изменении рН среды, что приводит к постепенному и контролируемому желированию альгината. Такой контроль позволяет использовать гели альгината как инъекционные гели, в результате чего альгинат желируется уже после инъекции (Hernández-González, Téllez-Jurado, Rodríguez-Lorenzo, 2020).

В таблице 1 приведен обзор разрабатываемых и исследуемых в последние 10 лет раневые и ожоговые покрытия/повязки, способные к высвобождению различных биоактивных веществ для местного воздействия на антибиотикорезистентные микроорганизмы, вызывающие ИКМТ. Как видно из данных в таблице 1, для разработки раневых повязок используется большое разнообразие полимерных материалов, из которых с помощью различных методов изготавливают различные формы раневых покрытий/повязок, в которые

инкапсулируют действующие лекарственные вещества различных групп. В основном в качестве раневых повязок и покрытий используют нетканые волокнистые материалы, пленки, порошки и гели, изготовленные методами электроформования, формования из раствора, послойного нанесения/ламинирования, 3D-печати, литья из расплава, желирования и лиофилизации. Для получения этих медицинских изделий и препаратов используют различные полимеры, как природные: альгинат, гиалуроновую кислоту, хитозан, хондроитин сульфат, бактериальную целлюлозу (БЦ, ВС), карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ, СМС), кардлан, пектин, поли-3-оксиалканоаты (ПОА), коллаген I типа, желатин, фиброин шелка, кератин, зеин; так и синтетические: поликапролактон (ПКЛ, PCL), полилактид (ПМК, PLA), поли(лактид-ко-гликолид) (ПМГК, PLGA), полиэтиленгликоль (ПЭГ, PEG), полиэтиленоксид (ПЭО, PEO), полиуретан-ПЭГ, поливиниловый спирт (ПВС, PVA), поливинилпирролидон (ПВП, PVP), полиэфир, полиакрилонитрил (ПАН, PAN), а также неорганические материалы: гидроксиапатит (ГА, HAp), пористый кремний.

Таблица 1. Обзор разрабатываемых и исследуемых раневых покрытий для лечения ИКМТ, вызванных антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Материал-носитель раневого покрытия/повязки	Метод изготовления	Активное действующее вещество	Модель раны или метод оценки	Микроорганизмы	Источник литературы
<i>1. С модельным действующим веществом, веществом другого действия или без него:</i>					
Коллаген I типа двухслойный	Лиофилизация, Радиационное сшивание (гамма-облучение)	–	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, на модели диабета (STZ), на крысах	–	Li et al., 2023
Фиброин шелка	Формирование двухслойной пленки (биламинат)	–	Модель гипертрофического рубца (ГР) на ухе, на кроликах	–	Zhou et al., 2024
ПЛГА	3D-печать	–	Оценка биосовместимости и заживления раны <i>in vivo</i> , небольшой хирургический надрез у мышей линии C57BL/6	–	Teo et al., 2023
ПКЛ (PCL) / ПМГК (PLGA)	Электроспиннинг, получение трехслойного скаффолда ПКЛ-ПМГК-ПКЛ	Родамин В (модельное вещество - флуорофор)	Исследование высвобождения вещества <i>in vitro</i>	–	Milosevic et al., 2020
Фиброин шелка / желатин	Электроспиннинг	Астрагалозид IV (растительное соединение - противовоспалительно е)	–	–	Shan et al., 2015

ПКЛ (PCL) / фиброин шелка / ГА (HAp)	Электроспиннинг	ГА (биоактивная керамика с остеокондуктивной активностью)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия), на крысах <i>Wistar</i>	–	Jia et al., 2022
Коллаген I типа / ГО (GO)	Лиофилизация композитного материала	N-ацетилцистеин NAC (антиоксидант)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия 20 мм), на модели диабета (STZ), на крысах	–	Qian et al., 2021
Коллаген / Альгинат	Лиофилизация с загрузкой нанокристаллов куркумина	Нанокристаллы куркумина (полифенол - антиоксидант)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, на модели диабета (STZ), на крысах	–	Mobaraki et al., 2021
Куркумин / Хитозан / ПЭО (PEO) / Коллаген	Электроспиннинг	Куркумин (полифенол – антиоксидант)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия), на крысах	–	Jirofti et al., 2021
Коллаген I типа	Лиофилизация + иммобилизация белка через CBD-связь	Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия 8 мм), на модели диабета (STZ), на крысах	–	Tan et al., 2012

II. Антибактериальное действующее вещество – наночастицы металлов, углеродные наноматериалы					
Композит ПОб с поли-3-оксиоктаноатом-со-3-оксидеканоатом	Электроспиннинг	Наночастицы серебра	Оценка цитотоксичности и экспрессии цитокинов <i>in vitro</i> эпителиальных клеток <i>HaCaT</i>	-	Kalaoglu-Altan et al., 2021
Композиты желатин-альгинат и желатин-хитозан, желатин	Лиофилизация	Наночастицы оксида серебра (Ag ₂ O)	Оценка антибактериальной активности и цитотоксичности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Li et al., 2024
Метилметакрилат	Полимеризация	Наночастицы серебра	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Fazly Bazzaz et al., 2014
Желатин / хитозан / наночастицы металлов / ГА	Формирование пленки методом литья	Наночастицы серебра, наночастицы меди	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия), на крысах Wistar	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Reyes-Blas et al., 2022
Пектин/ желатин	Формирование гидрогеля из раствора	Наночастицы оксида магния (MgO)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, модель инфицированной раны, на мышах <i>Swiss albino</i>	Широкий спектр микроорганизмов	Manaa et al., 2025
КМЦ (СМС) / ПВП (PVP)	Формирование гидрогеля из раствора	Наночастицы оксида цинка (ZnO)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, модель инфицирования раны, на мышах <i>Albino</i>	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Mondal et al., 2025

Текстильная основа из полиэфира	Нанесение покрытия из ZnO наночастиц	Наночастицы оксида цинка (ZnO)	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	Nourbakhsh et al., 2016
Бактериальная целлюлоза (БЦ) / желатин	Импregnация ГО в БЦ	ГО (GO)	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Aslam Khan et al., 2023
Окисленный пектин / Желатин	Формирование композита на основе восстановительного процесса <i>in situ</i>	Наночастицы серебра, ципрофлоксацин (антибиотик)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (экцизия 6 мм), у мышей C57BL/6J (<i>Mus musculus</i>)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Tummalapalli M. et al., 2016
Гибридный коллаген I типа	Лиофилизация + получение нанокompозита	Наночастицы серебра и катехин	Глубокий ожог II степени (контактный, инфицированный), у крыс <i>Sprague-Dawley</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Kalirajan et al., 2020
Желатин / гиалуроновая кислота / хондроитина сульфат	Лиофилизация	Наночастицы ZnO, наночастицы CuO и азиатиковая кислота	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>Escherichia coli</i>	Thanusha et al., 2018
ПВС (PVA) / Хитозан	Электроспиннинг	Мупирицин, наночастицы оксида церия (CeNPs) (с антиоксидантной активностью), хитозан	Оценка антибактериальной и антиоксидантной активности <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Liu et al., 2023
БЦ	Синтез наночастиц серебра в геле на основе БЦ	Наночастицы серебра, макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)	Хирургический надрез (1 см) и модель подкожной инфекции, на мышцах <i>BABL/C</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Zhang et al., 2025

Антибактериальное действующее вещество – антибиотики, антисептики					
ПКЛ (PCL)	Электроспиннинг	Хлорамфеникол (антибиотик)	Оценка прикрепления и биосовместимости фибробластов линии ВНК-21 и антибактериальной и противобиоплёночной активности <i>in vitro</i>	<i>P. aeruginosa, E. coli</i> (биоплёнки)	Lanno et al., 2020
ПМГК (PLGA) / альгинат натрия	Электроспиннинг ПМГК волокон с микрочастицами АЛГ, полученными распылительным высушиванием	Ципрофлоксацин (антибиотик)	Оценка формирования биопленки <i>in vitro</i>	<i>S. aureus</i>	Liu et al., 2017
БЦ / ПКЛ (PCL)	Смешивание ПКЛ с БЦ	Гентамицин и стрептомицин (антибиотики)	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>E. coli, S. aureus</i>	Das et al., 2022
Коллаген / ПВС (PVA) / ПАН (PAN)	Электроспиннинг	Неомицин (антибиотик - аминогликозид)	Термический ожог (контактный), на кроликах (самцы 3-4 кг)	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>K. pneumonia</i>	Alotaibi et al., 2023
ПКЛ (PCL)	Электроспиннинг с включением эфирных масел	Карвакрол CAR + Тимол ТНУ из эфирных масел (с бактериостатическими свойствами)	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus, E. coli</i>	Gómez et al., 2019
Антибактериальное действующее вещество – природные полимеры					
Поли-3-оксибутират (ПОБ, РНВ)	Электроспиннинг	ПОБ (собственная антимикробная активность биополимера)	Оценка антимикробной активности и формирования биопленки <i>in vitro</i>	<i>S. aureus, S. epidermidis, Candida albicans</i>	Munir et al., 2025

Растворимая форма хитозан-аргинина (SynePure™ Wound Cleanser) и гелевая форма гидроксипропилметилцеллюлозы с метилпарабеном и бетаином (Catasyn™ Advanced Technology Wound Hydrogel)	Коммерческие препараты для лечения ран SynePure™ Wound Cleanser (Synedgen, США) и Catasyn™ Advanced Technology Wound Hydrogel (Synedgen, США)	Хитозан	Частичный ожог II степени, 10-ти с контакт железной пластины темп. 200 °С, на свиньях, самках йоркширской породы	MRSA (биоплёнки)	Egro et al., 2022
Хитозан + альгинатный гидрогель	Послойное нанесение, получение гидрогелей	Хитозан	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия 12 мм), у крыс <i>Sprague-Dawley</i>	<i>S. aureus, E. coli</i>	Zhao et al., 2020
ПКЛ (PCL) / хитозан / ПВС (PVA)	Электроспиннинг	Хитозан	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине и термический ожог, на собаках	–	Gholipour-Kanani et al., 2018
Кератин (из волос человека) / Хитозан	Формирование пленки методом литья	Хитозан	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus, E. coli</i>	Tanabe et al., 2002
Кардлан / Хитозан / ПВС (PVA)	Формирование гидрогеля	Хитозан и розмариновая кислота	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, модель инфицированной раны, на мышах	MRSA	Gao et al., 2024

Антибактериальное действующее вещество – агенты для фототермической и фотодинамической терапии					
Гидрогель на основе хитозана с наночастицами меланина	Формирование гидрогеля через растворение хитозана в кислотах с загрузкой наночастицами	Наночастицы меланина (агент для фототермической терапии)	Модель подкожной инфекции, на мышах	MRSA	Jia et al., 2024
Фиброин шелка	Электроспиннинг	Хлорин е6 (Ce6) (агент для фотодинамической антибактериальной терапии)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия 10 мм), модель инфицированной раны, на мышах <i>BALB/c</i>	<i>S. aureus</i>	Li et al., 2024
Антибактериальное действующее вещество – антиоксиданты					
Гидрогель полиуретан-ПЭГ	Формирование гидрогеля путем самосборки с фенольными кислотами	Фенольные кислоты - галловая, кофейная, феруловая (полифенолы - антиоксиданты)	Оценка антимикробной активности <i>in vitro</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vakil et al., 2022
ПКЛ / хитозан	Электроспиннинг	Куркумин (полифенол - антиоксидант)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, на крысах	MRSA	Fahimirad S. et al., 2021
Фиброин шелка / хитозан	Электроспиннинг	Наночастицы серебра, куркумин (полифенол - антиоксидант)	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>S. aureus, E. coli</i>	Foroushani et al., 2022
Желатин / ПКЛ	Электроспиннинг	Кверцетин (флавоноид – антиоксидант) и ципрофлоксацин (антибиотик)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия), на мышах	<i>S. aureus</i>	Ajmal G. et al., 2019

Антибактериальное действующее вещество – растительные и животные продукты					
Силоксан-модифицированный ПВС (PVA) / полидофамин	Золь-гель метод, самополимеризация полидопамина	Берберин хлорид Bbn	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине, модель инфицированной раны, на крысах <i>Wistar</i>	MRSA	Kiumarsi et al., 2025
Коллаген I типа / гидролизированный коллаген	Электроспиннинг	Эфирное масло имбиря	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i>	Berechet et al., 2023
Пектин / мед	Формирование гидрогеля через кислотную обработку	Мёд Манука <i>Leptospermum scoparium</i> (с антимикробной и ранозаживляющей активностью)	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия 2×2 см), на крысах <i>Sprague-Dawley</i>	<i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> .	Giusto G. et al., 2018
Хитозан / ПКЛ / альгината метакрилат / полиуретан	Получение двухслойной конструкции: электроспиннингом (слой 1) и фотополимеризацией (слой 2)	Спиртовой экстракт прополиса	Хирургическое удаление участка кожи по всей толщине (эксцизия), на крысах <i>Wistar</i>	–	Karizmeh et al., 2022
Антибактериальное действующее вещество – антибактериальные пептиды					
ПКЛ	Электроспиннинг	Липофосфоноксин LPPO (синтетический антимикробный пептид)	Модель подкожной инфекции, на мышцах <i>C57BL/6J</i>	<i>S. aureus</i>	Do Pham et al., 2021
Гель на основе хитозана	Формирование геля через растворение хитозана в кислоте	Антимикробные пептиды ASP-1, ASP-2 (антимикробные пептиды)	Оценка антимикробной и противобиоплёночной активности <i>in vitro</i>	MRSA MDR, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	Neff et al., 2020

Покрытие на основе гиалуроновой кислоты (ГК, НА) / фиброина щелка / альгината	Лиофилизация, формирование покрытий	Антимикробный пептид катионный Tet213	Оценка антибактериальной активности <i>in vitro</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Lin et al., 2024
БЦ / полидофамин	Полидофаминовое покрытие	ε-полилизин (антимикробный пептид)	Хирургическое удаление фрагмента кожи по всей ее толщине, модель инфицированной раны, на крысах <i>Sprague-Dawley</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Wahid et al., 2021
ПОБ / Коллаген	Электроспиннинг	LL-37 (кателицидин, человеческий)	<i>In vitro</i> , экспериментальные модели на мышах с MRSA-инфицированными хирургическими ранами	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213), <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Bucki et al., 2010
Коллаген (препарат PURACOL)	Адсорбция / нековалентное связывание	hBD-1 (человеческий бета-дефензин 1)	<i>In vitro</i> , модель хронической раны <i>in vivo</i>	Широкий спектр микроорганизмов	Ganz et al., 2003
Коллаген-альгинат (препарат FIBRACOL)	Адсорбция (CBD-опосредованная)	hBD-3 (человеческий бета-дефензин 3)	<i>In vitro</i> , модель хронической раны <i>in vivo</i>	MRSA, широкий спектр микроорганизмов	Peng et al., 2022
Гидрогель диакрилат полиэтиленгликоля (PEGDA)	Фотополимеризация	hBD-4 (человеческий бета-дефензин 4)	Модель остеоартрита <i>in vitro</i> на хондроцитах	Микроорганизмы, вызывающие респираторные заболевания	Musumeci et al., 2022
Хитозан / Альгинат	Ионное гелеобразование, электроспиннинг	Лактоферрицин В (пептид лактоферрина)	Модель диабетической раны на мышах	Широкий спектр микроорганизмов	Wang et al., 2022

ПОБ (PHB) / Коллаген	Электроспиннинг	FALL-39 (предшественник LL-37)	Модель инфицированной раны, на крысах	Грамположительные и грамотрицательные бактерии	Lim et al., 2025
Коллаген-альгинат (FIBRACOL)	Адсорбция	hBD-2 (человеческий бета-дефензин 2)	Модель хронической раны, на мышах	Грамотрицательные бактерии	Da Silva et al. 2025
ПМГК (PLGA) / ПКЛ (PCL)	Электроспиннинг	Магейнин II (Magainin II)	Модель инфицированной раны, на мышах	Грамположительные и грамотрицательные бактерии, грибы	Rishi et al., 2018
Коллаген (химерный CBD-PG-1), поллулан	Ковалентное связывание / адсорбция, двуслойная конструкция	Протегрин-1 (PG-1)	Хирургическая модель раны, на мышах	MRSA, грамотрицательные бактерии	Nicholas et al., 2016
ПМГК (PLGA) / ПЭГ (PEG)	Получение наночастиц, электроспиннинг	Танатин (Thanatin)	Модель инфицированной раны, на мышах	Грамотрицательные и грамположительные бактерии	Deng et al., 2025
ПМГК (PLGA) / Хитозан	Электроспиннинг, получение наночастиц	Цекропин А (Cecropin A)	<i>In vitro</i> , биоплёнки, модель инфицированной раны, на мышах	Грамотрицательные бактерии	Rishi et al., 2018
БЦ / ПМГК (PLGA)	Электроспиннинг, импрегнация	Низин (Nisin)	Модель инфицированной раны, на мышах, крысах	MRSA, VRE, грамположительные бактерии	Rishi et al., 2018
ПКЛ (PCL) / ПМГК (PLGA)	Электроспиннинг	Грамицидин S (Gramicidin S)	Модель инфицированной раны, на мышах	Грамположительные, некоторые грамотрицательные бактерии	Vashchenko et al., 2024
Полимерные наночастицы	Наноинкапсуляция	WLBU2 (синтетический пептид)	Модель легочной инфекции, на мышах	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chen et al., 2018

Липосомы / ПЭГ-гидрогели	Самосборка, получение наночастиц	WR12 (синтетический пептид для доставки антибиотиков)	Модель стафилококковой инфекции кожи, на мышах	<i>Staphylococcus aureus</i> (золотистый стафилококк)	Mohamed et al., 2016
Хитозан / ПВС	Физическое сшивание (Freeze-Thaw), получение гидрогеля	Хитозан (Chitosan)	Модель инфицированной раны, на крысах	<i>Staphylococcus aureus</i> (золотистый стафилококк)	Zardawi et al., 2025
Коллаген / Альгинат / ПМГК (PLGA) / амфифильные пептиды	Электроспиннинг, самосборка	Полимиксин В (пептидный антибиотик)	Модель инфицированной раны, на мышах	Карбапенем-резистентные грамотрицательные бактерии: <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Xu L, et al., 2020
Антибактериальное действующее вещество – бактериолитические ферменты					
ПМК (PLA) / ПЭО (PEO)	3D-печать	Октенидин (антисептик) + лизостафин (бактериолитический фермент)	Хирургическое удаление фрагмента кожи по всей ее толщине, модель инфицирования раны, на мышах	MRSA	Mattar et al., 2025
Антибактериальное действующее вещество – бактериофаги					
ПВС (PVA) / Альгинат натрия	Формирование гидрогеля через ионное сшивание Ca ²⁺	Бактериофаг MR10 + миноциклин (антибиотик)	Термический ожог, модель инфицированной раны, на мышах <i>BALB/c</i>	MRSA	Kaur et al., 2019

В эти медицинские изделия для придания им антибактериальной активности инкапсулируют для высвобождения и местного антибактериального действия различные активные действующие вещества с известной и потенциальной антимикробной и другой биологической активностью:

- 1) неорганические вещества и наноматериалы: оксид серебра (Ag_2O), наночастицы серебра, графена оксид (ГО, GO), наночастицы оксида цинка (ZnO), наночастицы оксида меди (CuO), углеродные квантовые точки, ГА;
- 2) биополимеры: хитозан, полидопамин, ϵ -полилизин;
- 3) полифенолы: розмариновая кислота катехин, карвакрол, тимол;
- 4) антибиотики: хлорамфеникол, ципрофлоксацин, гентамицин, стрептомицин, миноциклин, низин, грамицидин S, полимиксин B;
- 5) синтетические антисептики: октенидин,
- 6) фототермальные агенты;
- 7) различные природные биоактивные вещества: куркумин, неомицин, астрагалозид IV, фенольные кислоты (галловая, кофейная, феруловая), азиатиковая кислота, берберины гидрохлорид, N-ацетилцистеин, азиатикозид, кверцетин;
- 8) антимикробные пептиды: ASP-1, ASP-2; A24, LPPO, LL-37, FALL-39, HNP-1, hBD-1, hBD-2, hBD-3, hBD-4, RNase 7, DCD-1L, лактоферрицин B, магейнин II, PG-1, танатин, цекропин A, аципенсин-1, WLBU2, WR12, D-IK8, глутоксим, ZP2;
- 9) цитокины и ростовые факторы: гранулоцитарно-макрофаговый колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, GM-CSF), фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС, VEGF);
- 10) бактериолитические ферменты: лизостафин, эндолизины;
- 11) бактериофаги: бактериофаг MR10;
- 12) природные материалы: мед манука.

Как видно из таблицы 1, подавляющее большинство используемых в новых раневых покрытиях и повязках антибактериальных активных веществ –

не антибиотики, что связано с проблемой выработки устойчивости у бактерий, вызывающих ИКМГ, к антибиотикам.

Открытие антибиотиков является одним из важнейших достижений здравоохранения XX века, позволившим спасти бесчисленное количество человеческих жизней. Расцвет противомикробных препаратов, длившийся до начала 1970-х годов, привел к открытию многочисленных современных классов антибиотиков, с помощью которых большинство серьезных бактериальных инфекций, таких как пневмонии, бактериемии и сепсис поддаются контролю. Однако из-за активного внедрения антибиотикотерапии, бессистемного назначения и потребления антибактериальных препаратов в последние годы остро стоит проблема распространения множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) среди микроорганизмов, вплоть до появления панрезистентных штаммов, полностью устойчивых ко всем известным на данный момент препаратам.

Быстрый рост числа новых антибиотиков в 50-60-х годах 20-го века в 00-е годы нашего века сменился умеренным развитием исследований таких терапевтических средств из-за растущих коммерческих рисков, связанных с появлением бактериальной резистентности. Это привело к смещению внимания к разработке производных известных антибиотиков, а не к открытию противомикробных препаратов с принципиально новыми механизмами действия. Так, по статистике, более 80% вновь одобренных препаратов относятся к существующим классам антибиотиков, для которых установлены механизмы развития резистентности. В 2021 г. ВОЗ опубликовал список из 77 противомикробных препаратов, находящихся на этапе клинической разработки, 45 из которых представляют «традиционные» классы антибиотиков. Двадцать семь из них предназначены для лечения заболеваний, вызванных возбудителями, включенными в список приоритетных патогенов (таких как *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* и др.), и лишь шесть отнесены к категории инновационных (WHO, 2021).

Развитие резистентности к антибиотикам связано с тем, что бактерии – это динамичные живые организмы, которые со временем приспосабливаются к изменяющимся условиям окружающей среды. Их основная цель – расти, выживать и распространяться как можно шире. Соответственно, бактерии эволюционируют таким образом, чтобы обеспечить свое дальнейшее существование и приспособиться к окружающей среде. Если какое-либо вещество, например, антибиотик, препятствует их развитию, могут происходить генетические изменения, делающие бактерии более устойчивыми к лекарственным веществам, используемым для лечения инфекционного заболевания, что будет способствовать их выживанию. Бактерии могут сделать антибиотики неэффективными и бесполезными путем задействования целого ряда молекулярных путей (рис. 9):

- **Снижение клеточного захвата.** Поступление антибиотика может быть уменьшено за счёт изменений в структуре поверхностной оболочки. Например, у грамотрицательных бактерий причиной устойчивости может быть модификация или уменьшение числа поринов или мутация в гене порина.
- **Изоляция молекул антибиотика внутри бактерии (защита мишени):** данный механизм включает физическую ассоциацию белка, защищающего мишень, причём это взаимодействие не вызывает необратимых изменений ни в мишени, ни в антибиотике.
- **Модификации сайта связывания антибиотика.** Метилирование остатка аденина в пептидилтрансферазе 23S рРНК снижает аффинность фермента к антибиотику, не влияя на синтез белка, и это способствует развитию устойчивости к эритромицину; ещё одним важным примером являются пенициллинсвязывающие белки, модифицированные у MRSA.
- **Обратное выведение антибиотика через эффлюксные насосы:** антибиотики, поглощённые бактериальными клетками, могут быть выведены наружу с помощью энергозависимых эффлюксных насосов.

- Часто у устойчивых к антибиотикам бактерий наблюдается повышенная экспрессия генов этих белков.
- **Модификация структуры липополисахарида (ЛПС, LPS):** в присутствии некоторых антибиотиков, например, полимиксина, бактерии активируют систему модификации липополисахарида, которая включает изменение белков созревания ЛПС и встраивание новых цепей. Это позволяет бактериям снизить проницаемость их оболочки для антибиотиков и избежать распознавания иммунной системой хозяина.
 - **Продукция расщепляющих антибиотики ферментов:** если определенные ферменты, вырабатываемые бактериями, избирательно инактивируют антибиотик, тот теряет свою биологическую функцию. Например, это происходит, когда β -лактамазы разрушают β -лактамные антибиотики. Некоторые бактерии продуцируют β -лактамазы расширенного спектра, которые обладают аналогичными инактивирующими свойствами и затрудняют их уничтожение. Кроме того, эффективность некоторых антибиотиков может снижаться из-за других ферментов, таких как ацетилтрансферазы, фосфотрансферазы и аденилтрансферазы.
 - **Включение альтернативных метаболических путей:** например, в случае с сульфаниламидами бактерии, подвергшиеся воздействию сульфаниамидов, продолжают синтезировать фолиевую кислоту по альтернативному метаболическому пути.
 - **Приобретение генов устойчивости к антибиотику:** гены устойчивости распространяются среди бактериальных видов благодаря сотрудничеству микроорганизмов и обмену генетической информацией путем горизонтального переноса генов.
 - **Формирование капсулы и биопленки:** биопленка в основном состоит из сети внеклеточного полимерного матрикса. Многие антибиотики, такие как аминогликозиды, не могут проникнуть через этот укрепленный матрикс из-за электростатических сил отталкивания.

- **Нахождение в состоянии покоя:** персистирующие клетки, физиологически неактивная субпопуляция бактерий, более устойчивы к антибиотикам, чем активные бактерии (Nordmann, Dortet & Poirel, 2012).

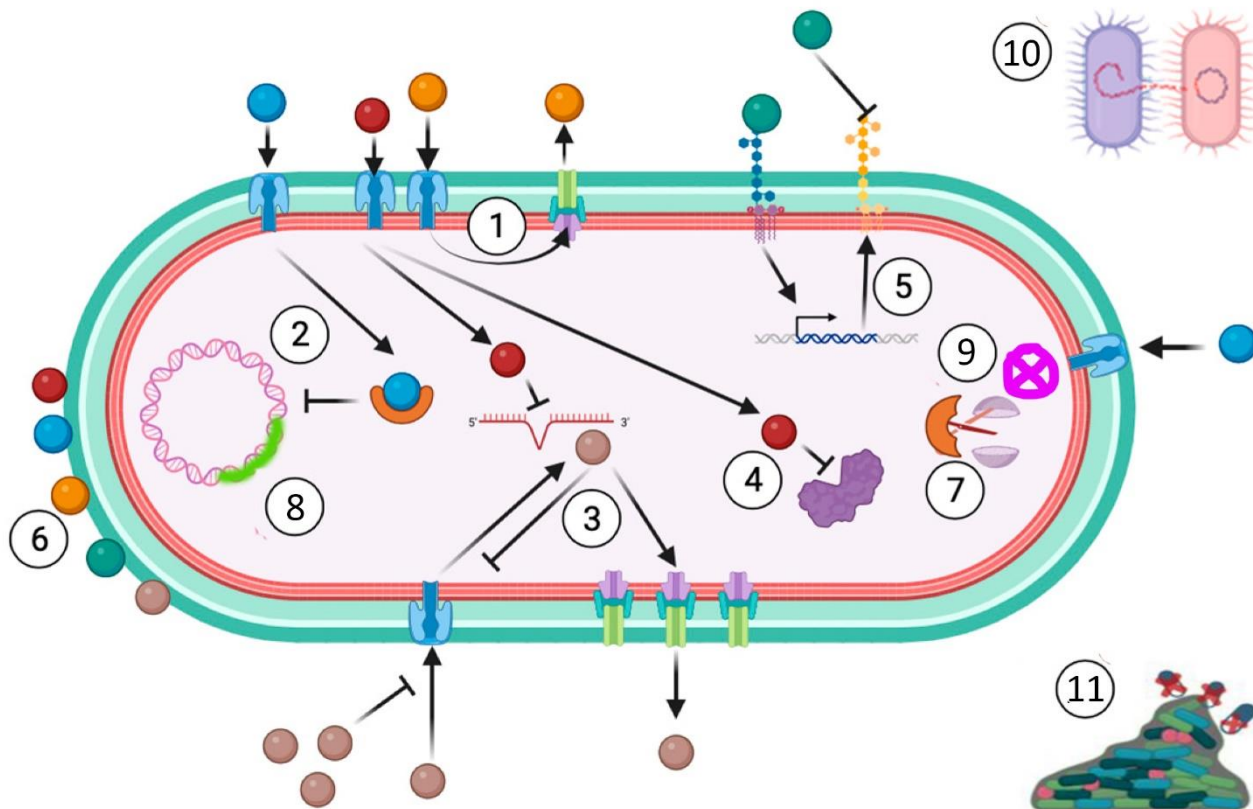


Рисунок 9. Возможные механизмы развития устойчивости к антибиотикам: (1) обратное выведение антибиотика через эффлюксные насосы; (2) изоляция молекул антибиотика внутри бактерии (защита мишени); (3) снижение клеточного захвата антибиотика; (4) модификации сайта связывания антибиотика; (5) модификация структуры ЛПС; (6) формирование физического барьера (капсулы); (7) продукция расщепляющих антибиотики ферментов; (8) наличие плазмиды, содержащей гены устойчивости к антибиотику; (9) включение альтернативных метаболических путей; (10) совместное использование генов устойчивости к бактериями; (11) образование защитного внеклеточного полимерного матрикса бактериальной биопленки (адаптировано из Nordmann, Dortet & Poirel, 2012).

Важно учитывать, что несмотря на то, что разработка терапевтических средств на основе производных известных антибиотиков позволяет снизить коммерческие риски, связанные с созданием новых терапевтических средств, отсутствие принципиальных изменений нынешней практики разработки и применения антибактериальных средств, не позволит решить проблему антимикробной устойчивости, и новые антибиотики, как и существующие, будут утрачивать свою эффективность. Уже сейчас существует острая потребность в новых противомикробных препаратах для лечения грамотрицательных бактерий, устойчивых к карбапенемам, цефалоспорином 3 поколения, фторхинолонам. Борьба с распространением невосприимчивых к существующим антибактериальным средствам патогенов, у которых происходит накопление и выработка новых механизмов резистентности, является комплексной проблемой. Разработка инновационных или дополнение уже известных классов антибактериальных средств на основе низкомолекулярных соединений практически зашла в тупик, так как бактерии вырабатывают различные механизмы устойчивости к ним ещё до выхода препаратов на целевой рынок или в первые годы использования (Ventola, 2015). В соответствии с данными ВОЗ актуальной задачей является интенсификация инновационной исследовательской деятельности в таких областях, как поиск и разработка новых противомикробных препаратов, особенно предназначенных для борьбы с наиболее серьезными грамотрицательными бактериями, в частности карбапенем-резистентными представителями семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* (WHO, 2017). В связи с этим, ведется активный поиск альтернативных подходов к ограничению возникновения бремени резистентных инфекционных агентов, что диктует актуальность и востребованность разработки новейших средств, отличающихся в механизмах действия от традиционных антибиотических препаратов (Theuretzbacher et al., 2020).

Так, около 8-10% проектов, находящихся на этапе доклинических исследований, связаны с бактериофагами и их производными продуктами

(Theuretzbacher et al., 2020). При этом, использование бактериофагов имеет достаточно длительную историю применения и существуют зарегистрированные препараты изолированных и комбинированных коктейлей бактериофагов, которые применяют для лечения инфекций (Gordillo Altamirano et al., 2019; Zyman et al., 2022). Несмотря на все преимущества антибактериальной терапии на основе бактериофагов, прежде всего, преодоление проблемы антибиотикорезистентности и снижение токсичности благодаря высокой селективности действия, недостатки их весьма велики. Например, бактериофаги могут переносить гены бактериальных токсинов, они обладают высокой иммуногенностью и узким спектром действия (Nilsson et al., 2014). Поэтому, в качестве альтернативы, рассматривается применение не цельных фаговых препаратов, а антибактериальных агентов на основе их литических ферментов - эндолизиннов, способных расщеплять пептидогликан клеточной стенки бактерий, что влечет за собой гибель бактерии вследствие гипотонического лизиса.

Многие антибактериальные пептиды и белки являются катионными полимерами, тогда как многие полисахариды, часто используемые для изготовления раневых покрытий на основе гелей и матриц, богаты отрицательно заряженными группами, что дает возможность для эффективного инкорпорирования пептидов и белков в гидрогель с последующим пролонгированным (а не мгновенным) высвобождением, которое обеспечивается удерживанием пептидов/белков в нем за счёт ионных связей. При этом, в зависимости от мономерного состава и молекулярной массы, свойства полисахаридов и гидрогелей на их основе меняются, что дает возможность подбирать полимеры с нужными характеристиками для конкретного применения.

Таким образом, наиболее перспективными направлениями являются использование в составе раневых покрытий в качестве действующих веществ белковой природы: антибактериальных пептидов и бактериостатических ферментов.

2.3. Антибактериальные пептиды и полимерные системы их доставки как альтернатива традиционным антибактериальным препаратам для лечения инфицированных ран

Антибактериальные пептиды (АБП) представляют собой гетерогенную группу олигопептидов, обычно состоящих из 12–100 аминокислотных остатков (Zasloff, 2002; Hancock & Sahl, 2006). Являясь ключевыми эффекторными молекулами врожденного иммунитета, они демонстрируют консервативность на всех уровнях эволюции – от бактерий (бактериоцины) до высших эукариот. Для подавляющего большинства АБП характерен ряд общих физико-химических параметров, определяющих их биологическую активность и селективность в отношении прокариотических клеток.

2.3.1. Физико-химические характеристики, определяющие биологическую активность АБП

Биологическая функция АБП неразрывно связана с их способностью взаимодействовать с липидными мембранами, что обеспечивается тремя ключевыми параметрами:

- **Катионность (суммарный положительный заряд).** При нейтральном рН суммарный заряд варьирует от +2 до +9, что обеспечивается избытком остатков аргинина и лизина (Brogden, 2005). Гуанидиновая группа аргинина, в отличие от аминогруппы лизина, обладает способностью к образованию бидентатных водородных связей с фосфатными группами липидов, что усиливает энергию связывания. Высокий положительный заряд необходим для первичного электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными компонентами бактериальной поверхности: ЛПС наружной мембраны грамотрицательных бактерий и тейхоевыми кислотами клеточной стенки грамположительных бактерий.
- **Амфифильность и формирование гидрофобных доменов.** Наличие гидрофобных остатков (*Leu, Ile, Val, Phe, Trp*) составляет, как правило, 40–60% от всех аминокислот. При формировании вторичной структуры (α -

спирали или β -складки) эти остатки пространственно группируются, образуя на поверхности молекулы четко выраженные гидрофобные домены (Yeaman & Yount, 2003). Именно наличие таких доменов, отделенных от заряженных участков, придает молекуле амфифильность, позволяя ей встраиваться в пограничный слой липидного бислоя (гидрофильные головки — гидрофобные хвосты).

- **Потенциал связывания с белками (индекс Бомана).** Этот расчётный параметр свидетельствует о способности пептида взаимодействовать не только с липидными мембранами, но и с белками-рецепторами или внеклеточными матриксными белками, что важно для иммуномодулирующей функции АБП (Savitskaya et al., 2023).

Молекулярная масса АБП, как правило, не превышает 10-15 кДа. Например, для сшитого катионного гидрофобного альфа-спирального пептида с низкой молекулярной массой она составляет 2714 Да (Yeaman & Yount, 2003), что обеспечивает высокую скорость диффузии в тканях. Вторичная структура АБП может быть представлена α -спиралью, β -многоскладчатой конформацией (стабилизированной двумя или более дисульфидными связями), β -шпилькой или петлей (формирующейся за счёт единственной дисульфидной связи и/или циклизации пептидной цепи) (Brogden, 2005; Min et al., 2024). Эти структурные особенности являются фундаментальной основой для их взаимодействия с биологическими мембранами.

Для понимания применимости АБП в регенеративной медицине наиболее значимо выделение следующих классов на основе происхождения, структуры и биологических свойств (рис. 10):

- **Эндогенные пептиды млекопитающих. Кателицидины** представлены единственным человеческим представителем — пептидом LL-37 и его производными (например, KR-12). LL-37 характеризуется не только прямой антимикробной активностью, но и выраженными иммуномодулирующими свойствами, выступая в роли хемоаттрактанта для иммунных клеток и стимулируя ангиогенез (Min et al., 2024; Savitskaya

et al., 2023). Однако его клиническое применение ограничено высокой чувствительностью к протеолизу в раневом экссудате (Fjell et al., 2011). Для преодоления этого разработаны укороченные аналоги, такие как KR-12, сохраняющие активность, но менее подверженные ферментативной деградации. **Дефензины (α и β)** являются одними из наиболее изученных эндогенных пептидов млекопитающих. Например, человеческие β -дефензины (hBD-1, -2, -3) стабильны в условиях раневого микроокружения и активны против широкого спектра микроорганизмов, включая *S. aureus* (Ganz, 2003; Sun, 2025). Их структура стабилизирована тремя дисульфидными связями, что придает им высокую протеолитическую устойчивость. β -Дефензин-3 (hBD-3) сохраняет активность в присутствии физиологических концентраций солей, что выгодно отличает его от многих других АБП.

- **Пептиды из природных источников (животные, насекомые).** Магайнин II (из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*) и мелиттин (из пчелиного яда) обладают высокой активностью, однако их применение ограничено цитотоксичностью в отношении клеток млекопитающих. Цитотоксические эффекты обусловлены высокой долей гидрофобных аминокислотных остатков, что усиливает их неспецифическое взаимодействие с цвиттерионными (нейтральными) фосфолипидами мембран эукариотических клеток (фосфатидилхолин, сфингомиелин), приводя к их дестабилизации по механизму «бочки» (barrel-stave) (Patel et al., 2025; Roque-Borda et al., 2025).
- **Синтетические и инженерные пептиды.** Примером служит пептид DJK-5, созданный на основе природных последовательностей. Посредством замены L-аминокислот на D-энантиомеры или использования непептидных остовов удастся повысить стабильность к протеазам и снизить неспецифическую цитотоксичность (Yadav et al., 2024; Fjell et al., 2011). D-энантиомеры не узнаются ферментами, что увеличивает время их полужизни в тканях.

Для более строгого химического понимания используют классификацию, предложенную в работах Хэнкока и др. (Hancock & Sahl, 2006; Savitskaya et al., 2023; Zasloff, 2002; Sun, 2025; Netta et al., 2024), где акцент делается на пространственной укладке цепи. Классификация по типу вторичной структуры (рис. 10):

- **Класс I: Линейные α -спиральные пептиды.** В водном растворе часто не структурированы, но при контакте с мембраной или в гидрофобном окружении формируют амфипатическую α -спираль с четким разделением на гидрофильную и гидрофобную поверхности (например, магаинин, меллитин, цекропин P1, LL-37) (Zasloff, 2002; Hancock & Sahl, 2006).
- **Класс II: Пептиды с преобладанием β -структуры.** Содержат 2–4 дисульфидных мостика, стабилизирующих β -листы, что формирует жесткие гидрофобные домены (например, α - и β -дефензины, протегрин-1, образующий β -шпильку).
- **Класс III: Пептиды с петлевой структурой.** Характеризуются одной ковалентной связью (дисульфидной или тиоэфирной), замыкающей цепь в петлю (например, бактенецин).
- **Класс IV: Пептиды, обогащённые одной аминокислотой.** Например, АБП, богатые гистидином (гистатины), пролином (апидецины, PR-39), триптофаном (индолицидин), которые часто принимают вытянутую полипролиновую спираль типа II, где гидрофобные остатки также формируют кластеры для взаимодействия с мембраной (Sun, 2025).
- **Класс V: Пептиды со сложной пространственной организацией,** содержащие дисульфидные мостики, тиоэфирные циклы и другие ковалентные сшивки (к ним относятся дефензины, протегрины и лантибиотики) (Hancock & Sahl, 2006; Savitskaya et al., 2023).

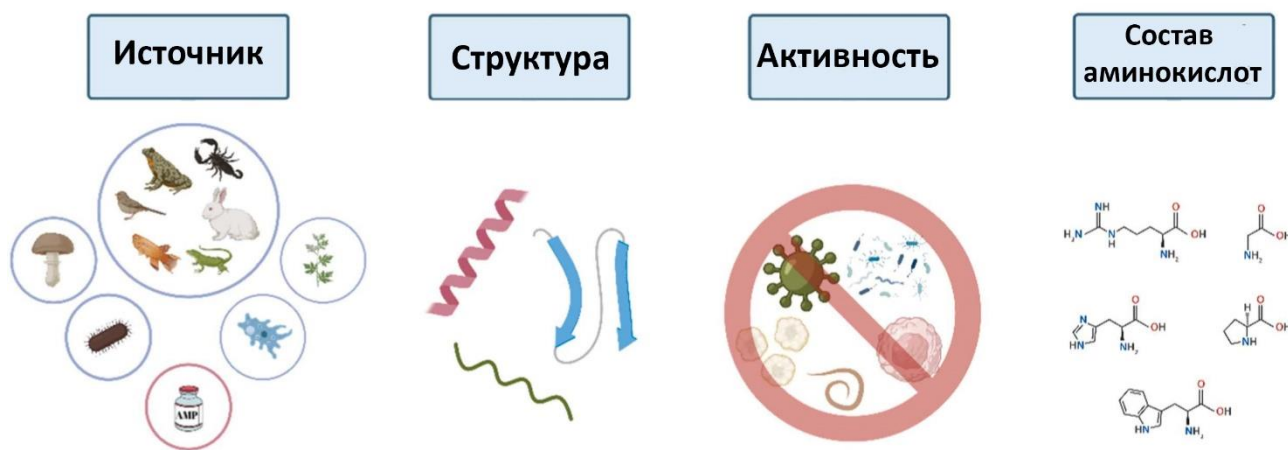


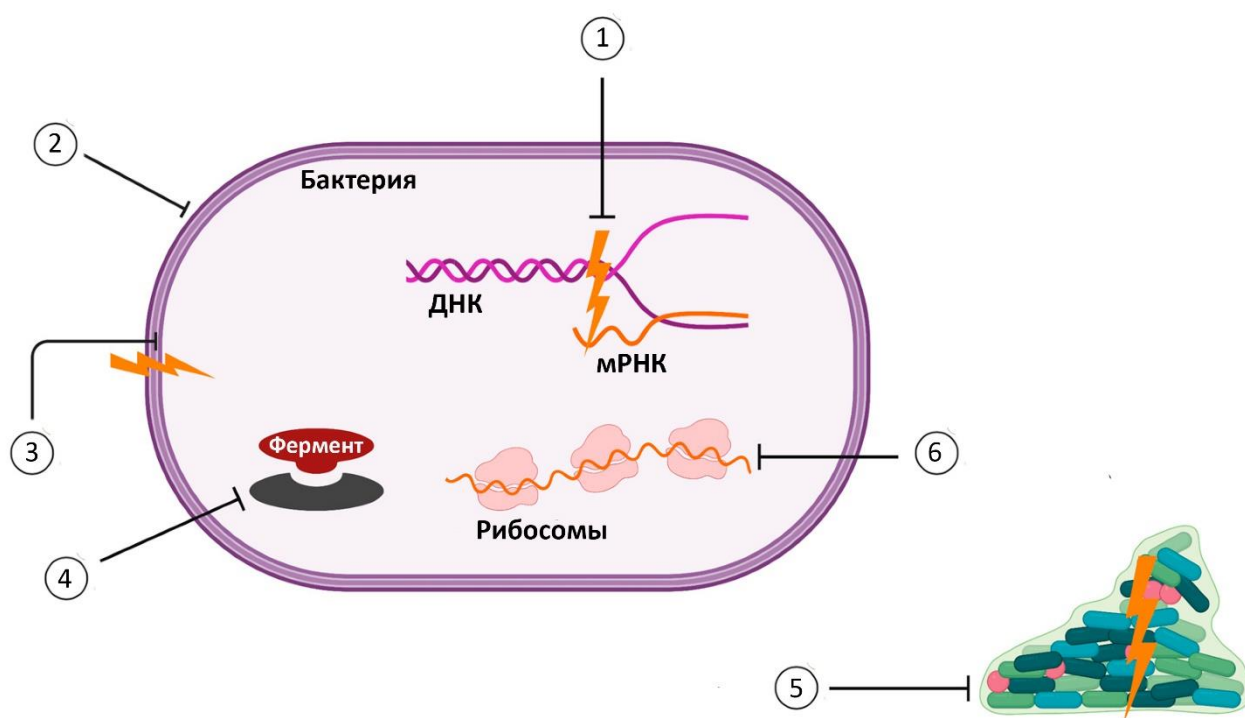
Рисунок 10. Классификация АБП 1) по происхождению: природные (млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб, насекомых, растений, грибов, бактерий) и синтетические; 2) по вторичной и третичной структуре: α -спираль, β -складка, сочетание α -спирали и β -складки, аморфная структура, наличие дисульфидных мостиков, тиоэфирных циклов или других ковалентных сшивок; 3) по биологической активности: антибактериальная, противовирусная, антипаразитарная, фунгицидная, противовоспалительная, противоопухолевая; 4) по составу аминокислот: богатые гистидином, пролином, триптофаном, аргинином, глицином (адаптировано из Netta et al., 2024).

Таким образом, несмотря на структурное разнообразие, объединяющим признаком АБП является их амфифильная катионная природа, позволяющая избирательно взаимодействовать с бактериальными мембранами за счёт электростатического взаимодействия с анионными компонентами клеточной поверхности и последующего погружения гидрофобных доменов в липидный бислой. Понимание тонкой структуры (тип вторичной укладки, характер сшивок, расположение гидрофобных доменов) позволяет прогнозировать не только антимикробную активность, но и токсичность, стабильность и иммуномодулирующие свойства, что критически важно при разработке гидрогелевых систем доставки.

2.3.2. Механизмы антимикробного действия: молекулярные и химические аспекты

В настоящее время существует множество гипотетических механизмов действия АБП, включая повреждение клеточной мембраны, ингибирование синтеза белков, ингибирование синтеза макромолекул, повреждение органелл, приводящее к фрагментации ДНК, ингибирование активности ферментов, а также антимикробное действие за счёт участия в иммунной регуляции (Mishra et al., 2025) (рис. 11).

А



Б

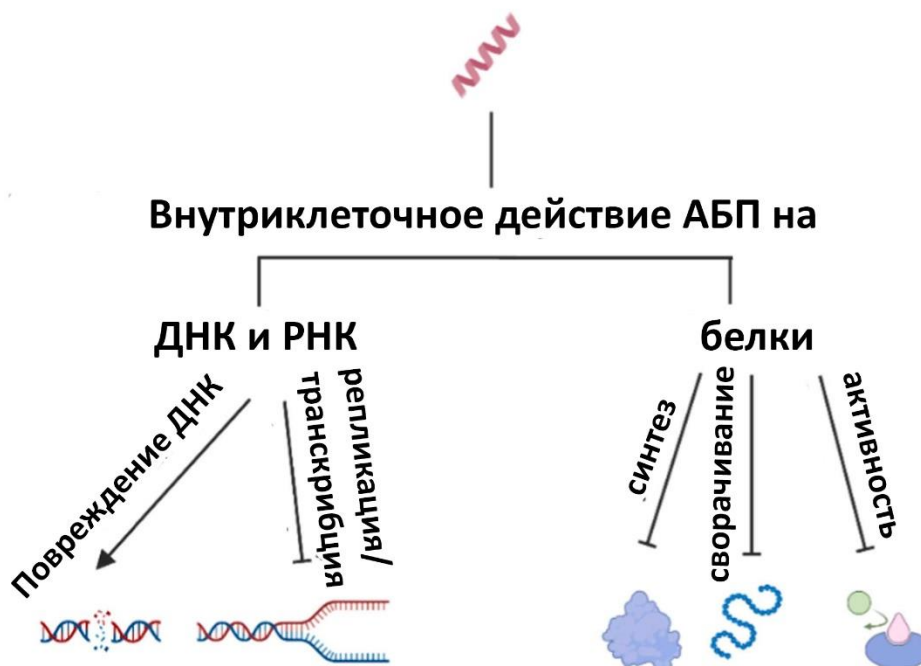


Рисунок 11. А – Различные механизмы проявления АБП антибактериальной активности: 1) повреждение и фрагментация ДНК и мРНК; 2) подавление синтеза клеточной стенки; 3) повреждение клеточной мембраны; 4) ингибирование активности ферментов; 5) повреждение и подавление формирования биопленки; 6) подавление синтеза белков. Б – Механизмы внутриклеточного действия АБП на нуклеиновые кислоты и белки (адаптировано из Mishra et al., 2025).

Однако, основной мишенью для большинства катионных АБП является цитоплазматическая мембрана бактерий. Молекулярные события, ведущие к нарушению ее целостности, можно разделить на несколько этапов, понимание которых требует рассмотрения химии межмолекулярных взаимодействий (Brogden, 2005; Patel et al., 2025).

Электростатическое притяжение и связывание. Поверхность бактериальной клетки несет значительный отрицательный заряд благодаря наличию липополисахаридов (у грамотрицательных бактерий) и тейхоевых кислот (у грамположительных), а также фосфатидилглицерола в мембране. Напротив, наружный слой мембраны клеток млекопитающих состоит преимущественно из цвиттерионных (суммарно нейтральных) фосфолипидов,

таких как фосфатидилхолин (Brogden, 2005). Положительно заряженные остатки лизина и, в особенности, аргинина в структуре АБП обеспечивают их электростатическое притяжение и селективное связывание с анионными компонентами бактериальной поверхности. Критическую роль в этом процессе играют именно аргининовые остатки, способные к образованию бидентатных водородных связей с фосфатными группами липидов (Sun, 2025; Savitskaya et al., 2023).

Внедрение и нарушение целостности мембраны. После связывания амфипатическая природа пептида позволяет его гидрофобным участкам встраиваться в липидный бислой. Существуют три основные модели, описывающие дальнейшие события (Ganz, 2003; Brogden, 2005; Yeaman & Yount, 2003; Netta et al., 2024) (рис. 12):

- Модель «бочонка» («barrel-stave»): Пептиды агрегируют и встраиваются в мембрану наподобие трансмембранных белков, формируя пору, где гидрофобные участки пептидов обращены к липидным хвостам, а гидрофильные — внутрь поры.
- Модель «тороидальной поры» («toroidal pore»): Пептиды индуцируют локальное искривление липидного монослоя, так что пора выстлана как пептидами, так и головками липидов. Эта модель характерна для многих катионных пептидов, включая магейнин.
- Модель «ковра» («carpet model»): Пептиды покрывают поверхность мембраны подобно ковру и при достижении критической концентрации действуют подобно детергенту, разрушая мембрану на мицеллы. Этот механизм часто описывают как «солубилизация мембраны».

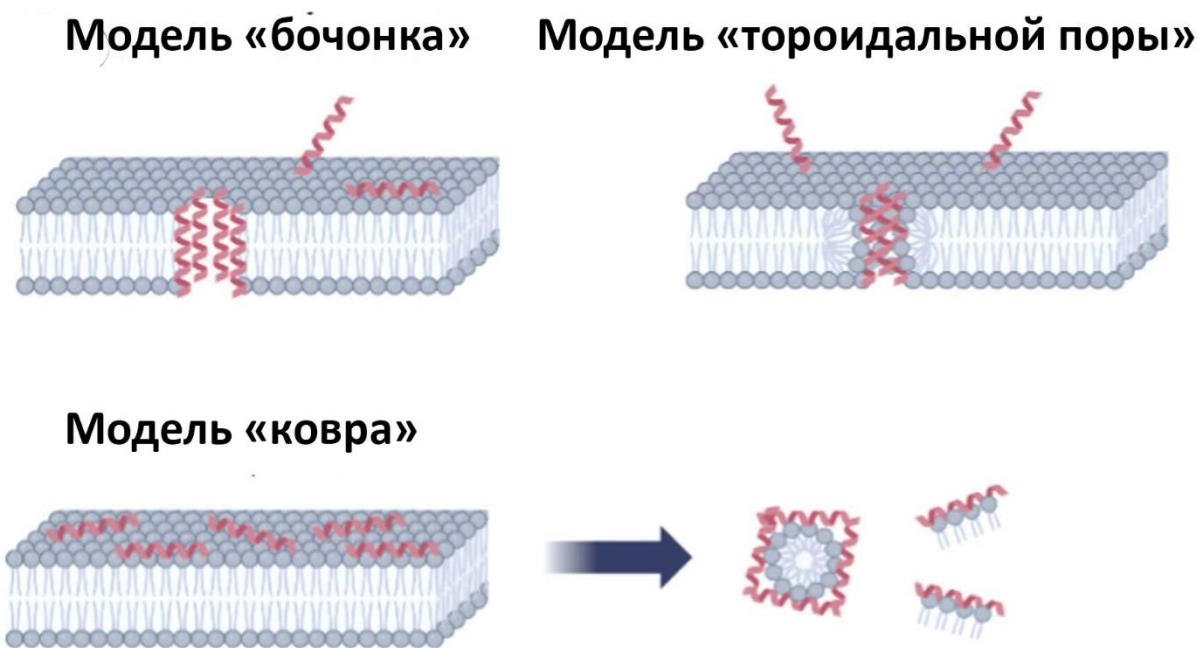


Рисунок 12. Мембранные механизмы действия антимикробных пептидов, которые включают формирование модели «бочонка», модели «тороидальной поры» и модели «ковра» (адаптировано из Netta et al., 2024).

Ингибирование метаболических процессов и воздействие на внутриклеточные мишени. Некоторые АБП способны проникать внутрь клетки, не вызывая полной литической дезинтеграции мембраны. Оказавшись в цитоплазме, они могут нарушать ключевые метаболические пути: ингибировать синтез клеточной стенки, нуклеиновых кислот или белков, подавлять активность ферментов энергетического обмена (например, в цикле трикарбоновых кислот), а также вмешиваться в процессы деления клетки и формирования биопленок (Ganz, 2003; Roque-Borda et al., 2025; Patel et al., 2025) (рис. 11).

2.3.3. Инкапсуляция АБП: стратегии и химия взаимодействий

Традиционные системные пути введения антибактериальных препаратов часто сопряжены с рядом ограничений, включая высокую системную токсичность, недостаточную биодоступность в очаге инфекции и развитие антибиотикорезистентности. Локальная доставка АБП с использованием полимерных носителей позволяет создать высокую терапевтическую

концентрацию непосредственно в месте инфицирования, минимизируя побочные эффекты.

Выбор стратегии инкапсуляции напрямую зависит от физико-химических свойств пептида (Fjell et al., 2011; Lee & Mooney, 2012).

Непосредственное включение (физическое распределение в матриксе).

Наиболее простой метод - раствор АБП смешивают с раствором биополимера-носителя, например, альгината, с последующим ионным сшиванием. Пептид удерживается в трехмерной сети геля за счёт стерических препятствий и, в случае катионных АБП, слабых электростатических взаимодействий с карбоксильными группами альгината. Однако для гидрофильных катионных пептидов этот подход часто приводит к быстрому высвобождению («burst release») из-за недостаточно прочного удерживания в гидрофильной пористой матрице, если в качестве основы используются полисахариды (Fjell et al., 2011). Скорость диффузии в таком случае зависит от размера пептида и плотности сшивки геля (концентрации Ca^{2+} и соотношения М/Г-блоков) (Yeaman & Yount, 2003; Lee & Mooney, 2012).

Ковалентная иммобилизация. Для пролонгированного локального действия пептид может быть химически пришит к полимерной цепи биополимера. Это достигается, например, путем активации карбоксильных групп некоторых полисахаридов (например, карбодиимидом (EDC)) с последующим образованием амидной связи с N-концом или ε-аминогруппой лизина в пептиде (Augst et al., 2006). Такой подход обеспечивает отсутствие вымывания, однако биологическая активность пептида может снизиться из-за стерических ограничений. Высвобождение происходит только при ферментативном расщеплении пептидного линкера или самой полимерной цепи. Перспективным направлением является использование линкеров, расщепляемых ферментами, специфичными для раневого микроокружения (например, матриксными металлопротеиназами (ММП, MMP)) (Zamani et al., 2025).

Формирование полиэлектролитных комплексов (ПЭК, PEC).

Катионные АБП могут образовывать ионные комплексы с противоположно

заряженными полимерами. Добавление в раствор одного анионного полимера, например, альгината, другого анионного полимера или, наоборот, предварительное комплексование АБП с полианионом (например, гиалуроновой кислотой) позволяет замедлить высвобождение (Augst et al., 2006). Высвобождение пептида из такого комплекса происходит в результате ионообменных процессов при контакте с раневым экссудатом, богатым ионами натрия (Zheng & Doyle, 2025).

Система «гель-в-геле» (наночастицы в матриксе). Наиболее универсальная стратегия для контроля кинетики предполагает предварительную загрузку АБП во вторичные носители — липосомы, полимерные наночастицы (например, из ПЛГА) или мицеллы. Затем эти наночастицы диспергируются в растворе полисахарида или белка перед гелеобразованием (Fjell et al., 2011; Zamani et al., 2025). Полисахаридный или белковый гель здесь выступает в роли первичного каркаса, предотвращающего быструю миграцию наночастиц и создающего дополнительный диффузионный барьер. Высвобождение АБП в таком случае контролируется двумя этапами: высвобождением из наночастицы и последующей диффузией через полимерный матрикс.

2.3.4. Механизмы высвобождения АБП и их кинетика

Несмотря на преимущества, многие гидрогели часто демонстрируют нежелательный «burst-эффект» (быстрое высвобождение большой дозы АБП в первые часы). Для решения этой проблемы разрабатываются композитные системы. Высвобождение АБП из композитных полимерных систем происходит под действием нескольких механизмов (Fjell et al., 2011; Lee & Mooney, 2012; Augst et al., 2006):

- **Диффузия.** Преобладает для пептидов, удерживаемых в матриксе за счёт нековалентных взаимодействий. В начальный момент происходит быстрая диссоциация молекул с поверхности геля («взрыв-высвобождение»), что клинически важно для создания высоких начальных концентраций и немедленного подавления инфекции. Затем следует более медленная диффузия из глубины матрицы.



- **Ионообменное высвобождение.** Характерно для АБП, связанных в полиэлектролитные комплексы. Катионы (Na^+ , Ca^{2+}), присутствующие в раневом экссудате в высоких концентрациях, конкурируют с пептидом за связывание с отрицательными зарядами носителя, вытесняя его в окружающую среду.
- **Высвобождение, обусловленное деградацией матрикса.** Происходит по мере поверхностной эрозии или деградации в объеме полимерной матрицы за счёт растворения, гидролиза сложноэфирных связей или ферментативного расщепления полимера (например, ферментами бактерий) или разрушения биodeградируемых наночастиц (гидролиза ПЛГК).
- **Стимул-чувствительное высвобождение.** Использование носителей, чувствительных к параметрам микроокружения инфицированной раны – низкому рН или повышенной концентрации ферментов (протеаз, липаз) – позволяет добиться направленной доставки именно в очаг воспаления.

Одним из подходов для модификации кинетики высвобождения АБП из полимерных систем является включение в матрицу гидрогеля дополнительных полимерных компонентов. Так, добавление целлюлозных нанофибрилл в матрицу альгината позволяет эффективно инкапсулировать гидрофобные антибиотики. Кинетика высвобождения в таких системах подчиняется модели Корсмейера-Пеппаса и характеризуется псевдо-фиковской диффузией (коэффициент $n < 0,45$), что указывает на контролируемый транспорт препарата в течение 48 часов (Lebedeva et al., 2024).

Формирование полиэлектролитных комплексов с хитозаном также зарекомендовало себя как эффективный метод модуляции высвобождения. Покрытие из хитозана на альгинатных гранулах позволило значительно снизить скорость набухания и, как следствие, замедлить высвобождение антибиотика (Zheng & Doyle, 2025). В системах альгинат-хитозан достигается пролонгированное высвобождение с сохранением фиковского механизма диффузии.

Стратегия «двойного инкапсулирования» предполагает создание иерархических структур. В этом случае антибиотик сначала заключается в наночастицы (например, хитозановые наночастицы), а затем диспергируется в альгинатном гидрогеле. Такой подход позволяет достичь многофазного высвобождения (Zamani et al., 2025).

Современные производственные технологии, такие как 3D-печать, также расширяют возможности биополимерных систем высвобождения АБП. Использование альгинатных гидрогелей, загруженных антибиотиками, в качестве «чернил» для печати костных имплантатов позволяет создавать персонализированные конструкции, обеспечивающие подавление микроорганизмов в зоне имплантации [Li et al., 2025].

Кинетика высвобождения из полимерных матриц определяется:

- Диффузией препарата через полимерную матрицу.
- Эрозией/деградацией полимера (за счёт гидролиза сложноэфирных связей).
- Комбинацией этих механизмов (Siermann & Siermann, 2012).

Для описания высвобождения АБП из альгинатных систем наиболее часто применяются следующие математические модели (Korsmeyer et al., 1983, Higuchi, 1963):

Модель Корсмейера-Пеппаса.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

где M_t – количество препарата, высвободившееся к моменту времени t ; M_∞ – общее количество препарата, высвобождающееся за весь процесс; k – константа скорости высвобождения, учитывающая структурные и геометрические характеристики системы; n – экспонента, характеризующая механизм транспорта ($n \leq 0,45$ соответствует фиковской диффузии, $0,45 < n < 0,89$ – аномальному (нефиковскому) транспорту, $n = 0,89$ – транспорту, лимитированному релаксацией полимерных цепей, $n > 0,89$ – транспорту типа «case II»).

Модель Хигучи (Higuchi, 1963):

$$Q = kt^{1/2} \quad (2)$$

где Q – количество препарата, высвободившееся за время t в расчёте на единицу площади поверхности; k – константа Хигучи, зависящая от коэффициента диффузии препарата в матриксе, его исходной концентрации и растворимости.

Модель описывает высвобождение из пористых матриц при условии псевдостационарного состояния и обычно применима к начальным стадиям процесса.

Модель первого порядка (Korsmeyer et al., 1983; часто используется в комбинации с другими моделями для описания высвобождения, лимитированного концентрацией):

$$\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right) = -kt \quad (3)$$

где M_t и M_∞ имеют те же значения, что и в модели Корсмейера-Пеппаса; k – константа скорости высвобождения первого порядка.

Данная модель характерна для систем, в которых скорость высвобождения пропорциональна остаточному количеству препарата в носителе (например, при ионообменном высвобождении или при растворении лекарственной формы с постоянной площадью поверхности).

2.3.5. Классификация систем доставки АБП

Несмотря на широкое распространение гидрогелевых систем, спектр современных платформ для направленного транспорта АБП постоянно расширяется. Разработка альтернативных систем направлена на решение специфических задач: преодоление биологических барьеров (например, гематоэнцефалического), обеспечение селективного накопления в определенных органах (легкие, костная ткань), внутриклеточная доставка для уничтожения персистирующих форм бактерий, а также создание мультимодальных систем, сочетающих терапию и диагностику.

Имеются следующие стратегии повышения эффективности систем доставки лекарств, в т.ч. АБП:

- **Мукоадгезивные системы.** Модификация поверхности наночастиц хитозаном или другими катионными полимерами для увеличения времени удержания на слизистых оболочках (например, в легочной ткани).
- **Внутриклеточная доставка.** Конъюгация с пептидами, способствующими проникновению в макрофаги, где часто персистируют микобактерии туберкулеза. Использование сидерофоров (железосвязывающих молекул) для активного транспорта через клеточные мембраны бактерий по механизму «тroyанского коня».
- **Триггерное высвобождение.** Включение в состав частиц кетальных линкеров, которые разрушаются в кислой среде лизосом или в очаге воспаления, обеспечивая быстрое высвобождение препарата именно внутри клетки-мишени.

В данной главе рассматриваются основные типы таких систем, их химические основы и механизмы действия.

Липосомальные системы доставки. Липосомы представляют собой сферические везикулы, состоящие из одного или нескольких липидных бислоев, окружающих внутреннее водное ядро. Их открытие стало важным этапом в фармакологии благодаря структурной аналогии с клеточными мембранами.

Основу липосом составляют природные или синтетические фосфолипиды (например, фосфатидилхолин). В зависимости от размера и числа бислоев различают: мультиламеллярные везикулы (MLV) – крупные частицы с несколькими концентрическими бислоями; малые моноламеллярные везикулы (SUV) – размером 20–100 нм, состоят из одного бислоя; крупные моноламеллярные везикулы (LUV) – размером 100–400 нм.

Благодаря амфифильной природе, липосомы могут инкапсулировать: гидрофильные антибиотики (аминогликозиды, β -лактамы), которые локализуются во внутренней водной фазе; гидрофобные антибиотики

(фторхинолоны, макролиды), которые встраиваются в липидный бислой (Torchilin, 2005).

Высвобождение препарата может происходить путем пассивной диффузии, слияния с мембраной бактериальной клетки или деградации под действием фосфолипаз. Для повышения селективности применяются: «стелс-липосомы» с модифицированной поверхностью полиэтиленгликолем (ПЭГ) для уклонения от опсонизации и захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы (Allen & Cullis, 2013); иммунолипосомы, конъюгированные с антителами или их фрагментами для распознавания специфических антигенов бактерий или инфицированных клеток. Так, липосомальные формы амфотерицина В (противогрибковый) и амикацина показали снижение нефротоксичности и повышение эффективности при системных инфекциях (Torchilin, 2005).

Полимерные наночастицы и мицеллы. Полимерные наноносители представляют собой твердые коллоидные частицы, в которых АБП либо растворен в матриксе (наносферы), либо заключен в центральное ядро, окруженное полимерной мембраной (нанокапсулы). Этот класс систем активно разрабатывается для лечения трудно купируемых инфекций, таких как туберкулез, где требуется внутриклеточная доставка и преодоление биологических барьеров.

В синтезе наночастиц для доставки АБП используются как природные, так и синтетические биodeградируемые полимеры: ПЛГК – наиболее изученный полимер с регулируемой скоростью деградации (Anderson & Shive, 2012); ПКЛ – гидрофобный полимер, обеспечивающий замедленное высвобождение; блок-сополимеры – например, ПКЛ-ПЭГ или ПМК-ПЭГ, которые самоорганизуются в структуры типа «ядро-оболочка». Выбор конкретного типа блок-сополимера существенно влияет на характеристики формируемых наночастиц и их пригодность для доставки антибиотиков. При разработке систем доставки антитуберкулезных препаратов особое внимание уделяется двум типам блок-сополимеров: ПКЛ-ПЭГ и ПМК-ПЭГ. Экспериментальные исследования

выявляют существенные различия в их свойствах. Системы на основе ПКЛ-ПЭГ характеризуются высокой загрузкой антибиотиков, что делает их предпочтительными для создания резервуара лекарственного вещества. Они демонстрируют высокую стабильность частиц, особенно при дополнительной модификации поверхности полилизинном или гепарином. Благодаря этим свойствам, ПКЛ-ПЭГ оптимальны для формирования гидрофобного ядра в частицах типа «ядро-оболочка», обеспечивая надежное удержание препарата до момента доставки. В свою очередь, системы на основе ПМК-ПЭГ показывают более низкую загрузку антибиотиков и меньшую стабильность по сравнению с ПКЛ-ПЭГ. Однако они открывают иные возможности для функционализации. В частности, ПМК-ПЭГ перспективны для модификации гликополимерами, что может быть использовано для придания частицам свойств молекулярного распознавания или улучшения взаимодействия с определенными типами клеточных мишеней. Таким образом, выбор между ПКЛ-ПЭГ и ПМК-ПЭГ диктуется конкретной терапевтической задачей: если приоритетом является высокая емкость и стабильность, предпочтение отдается ПКЛ-ПЭГ; если же необходима поверхностная модификация для активного таргетинга, системы на основе ПМК-ПЭГ могут оказаться более перспективными (Gref et al., 1994).

Металло-органические каркасы (МОКС, MOFs). Металло-органические каркасы представляют собой новый класс гибридных наноматериалов, которые в последние годы активно исследуются для адресной доставки антибиотиков. МОКС – это кристаллические координационные полимеры, состоящие из ионов металлов (узлов), соединенных органическими молекулами-линкерами. В результате формируется пористая трехмерная структура с чрезвычайно высокой удельной поверхностью (Horcajada et al., 2012). Уникальность МОКС заключается в их способности адсорбировать огромное количество лекарственного вещества в свои поры. Массовая доля антибиотика может достигать и даже превышать массу самого носителя (в некоторых исследованиях — до 127%). Для доставки АБП, таких как рифампицин, используются МОКС на основе хрома (MIL-101(Cr)) и терефталевой кислоты.

Ключевым преимуществом определенных типов МОКС является их способность к селективному накоплению в легких. Исследования показывают, что частицы NH₂-MIL-101(Cr) накапливаются в легочной ткани в концентрации, в 10 раз превышающей концентрацию в других органах. Предполагаемый механизм связан с уникальными физико-химическими свойствами поверхности частиц (размер, заряд, химический состав), которые определяют их взаимодействие с легочными капиллярами. В кровотоке стабильные каркасы MIL-101(Cr) не разрушаются. Высвобождение антибиотика происходит после поглощения наночастиц иммунными клетками в кислой среде лизосом, что обеспечивает пролонгированное действие непосредственно в очаге инфекции (Hercajada et al., 2012).

Системы на основе электроформованных волокон. Технология электроформования (электроспиннинга) позволяет получать ультратонкие полимерные волокна, которые могут служить матрицей для иммобилизации АБП и создания «умных» раневых покрытий. Метод основан на формировании из раствора полимера в электрическом поле полимерных волокон. При коаксиальном электроспиннинге получают волокна структуры «ядро-оболочка», где сердцевина содержит полимерную смесь с антибиотиком (например, метронидазолом), а оболочка выполняет защитную и барьерную функции (Sill & von Resum, 2008). При контакте с раневым экссудатом (жидкой средой) начинается диффузия антибиотика из волокон. Высокая площадь поверхности материала обеспечивает эффективную передачу препарата в ткани. В сухом состоянии структура герметична, что предотвращает деградацию антибиотика.

Такие системы позволяют минимизировать системную токсичность и снизить риск развития резистентности за счёт создания высоких локальных концентраций. Они перспективны для лечения инфицированных ран, ожогов и в стоматологии.

2.3.6. Применимость различных АБП в альгинатных системах

Выбор конкретного АБП и стратегии его инкапсуляции определяется его физико-химическими свойствами — растворимостью, зарядом, стабильностью — а также требуемым терапевтическим эффектом (Min et al., 2024; Savitskaya et al., 2023; Sun, 2025). Понимание этих основ позволяет более эффективно подходить к дизайну систем доставки на основе альгинатного гидрогеля, который используется для этой цели в практической части учебно-методического пособия.

АБП, пригодные для простого включения (гидрофильные и катионные). К этой группе относятся пептиды, хорошо растворимые в водной фазе и сохраняющие активность в условиях ионного гелеобразования (в присутствии Ca^{2+} и альгината). Наиболее характерные представители: человеческие β -дефензины hBD-1, hBD-2, hBD-3; лантибиотик низин; катионные полимеры, такие как ϵ -полилизин и хитозан. Будучи катионными, такие пептиды могут вступать в электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными карбоксильными группами альгината. Это создает естественный механизм замедления диффузии, однако для надежного пролонгирования эффекта часто требуются дополнительные меры: ковалентная иммобилизация (Augst et al., 2006), формирование полиэлектролитных комплексов или инкапсуляция в полисахаридные наночастицы.

АБП, требующие носителей или особых условий инкапсуляции (гидрофобные, нестабильные, агрегирующие). Пептиды с выраженной гидрофобностью (магейнин, меллитин, индолицидин) склонны к агрегации в водной среде и неспецифической сорбции, что снижает их биодоступность. Для их доставки используются носители с гидрофобными доменами: мицеллы ПАВ, липосомы, наночастицы на основе ПЛК/ПЛГК (Roque-Borda et al., 2025; Yadav et al., 2024).

Идеальные кандидаты для систем «гель-в-геле». Стратегия двойной инкапсуляции наиболее оправдана для пептидов, требующих защиты от биodeградации или сверхпролонгированного высвобождения. Классическим

примером является человеческий кателицидин LL-37: будучи высокоэффективным, он чувствителен к протеазам раневого экссудата, и его инкапсуляция в липосомы внутри альгинатного геля значительно продлевает срок действия (Fjell et al., 2011). Синтетические пептиды DJK-5 и 1018, активные в отношении биопленок, приобретают большую эффективность благодаря пролонгированной доставке.

Комбинированные системы. Наиболее перспективные подходы в регенеративной медицине основаны на синергетическом действии нескольких агентов в одной альгинатной матрице. Примеры включают сочетание АБП с факторами роста для одновременной борьбы с инфекцией и стимуляции ангиогенеза (Min et al., 2024), а также комбинацию АБП с наночастицами металлов, что позволяет расширить спектр действия и снизить вероятность развития резистентности (Yadav et al., 2024).

Эффективность альгинатных систем доставки АБП определяется не только свойствами самого носителя, но и его соответствием патофизиологическим особенностям конкретного типа раны или заболевания. Адресный подход к выбору системы доставки позволяет максимально реализовать терапевтический потенциал АБП и ускорить процессы регенерации.

Хронические раны (диабетическая стопа, трофические язвы, венозные язвы). Патофизиология хронических ран характеризуется тремя ключевыми факторами: формированием бактериальных биопленок, персистирующим воспалением и нарушением ангиогенеза. Биопленки создают физический барьер для проникновения антимикробных агентов и служат постоянным источником патогенов, поддерживая хроническое воспаление. В таких условиях оптимальной стратегией является использование АБП с двойным механизмом действия, таких как кателицидин LL-37 или человеческий β -дефензин-3 (hBD-3). Эти пептиды не только нарушают целостность мембран бактерий в биопленке, но и обладают иммуномодулирующей активностью: они стимулируют ангиогенез, привлекают иммунные клетки и активируют пролиферацию фибробластов.

Критическое значение для хронических ран имеет пролонгированное высвобождение АБП из альгинатного матрикса. Постоянное поддержание терапевтической концентрации необходимо для подавления реформирования биопленки, которое в противном случае происходит в течение нескольких часов после однократного применения антибиотика. Кроме того, альгинатный гидрогель обеспечивает влажную среду, способствующую аутолитической дебридментации и миграции кератиноцитов, что особенно важно при лечении трофических язв.

Острые инфицированные раны (ожоги, травмы, послеоперационные раны). В отличие от хронических, острые раны характеризуются высоким риском быстрой колонизации патогенами, прежде всего *S. aureus* и *P. aeruginosa*, при отсутствии сформировавшейся биопленки. Здесь первостепенной задачей является экстренное снижение бактериальной нагрузки до того, как микроорганизмы сформируют устойчивые сообщества. Поэтому для острых ран предпочтительны системы с быстрым начальным высвобождением (burst-эффектом), обеспечивающие создание высокой концентрации АБП в первые часы после нанесения. Целесообразно использование пептидов широкого спектра действия, таких как магейнин или индолицидин. Перспективным направлением является комбинирование АБП с традиционными антибиотиками (например, ванкомицином или гентамицином) в одном альгинатном гидрогеле. Такой подход позволяет достичь синергического эффекта за счёт разных механизмов действия и снизить вероятность развития антибиотикорезистентности. Кроме того, при ожогах альгинатный гель выполняет важную барьерную функцию, предотвращая потерю жидкости и вторичное инфицирование.

Заболевания пародонта и остеомиелит. Лечение костных инфекций и заболеваний пародонта осложняется труднодоступностью очага поражения и необходимостью одновременно бороться с инфекцией и стимулировать регенерацию костной ткани. Для этих целей оптимально использовать инъекционные или формируемые *in situ* альгинатные гидрогели, которые в

жидком виде вводятся в костный карман или дефект и затвердевают там под действием ионов кальция, содержащихся в тканевой жидкости. Такие системы обеспечивают плотное заполнение полости и локальное высвобождение препарата.

Наибольший терапевтический потенциал имеют комбинированные конструкции, включающие как антибактериальный компонент, так и остеогенные факторы. Например, сочетание костного морфогенетического белка-2 (BMP-2) с hBD-3 в одном альгинатном геле позволяет одновременно подавлять бактериальную инфекцию и стимулировать дифференцировку остеобластов, что критически важно для восстановления костной ткани при остеомиелите или тяжелом пародонтите.

Дерматологические инфекции и атопический дерматит. При дерматологических заболеваниях, таких как атопический дерматит, ключевую роль играет нарушение кожного барьера и хроническая колонизация *S. aureus*, которая усугубляет воспаление и поддерживает патологический процесс. Здесь требуются системы доставки с минимальной цитотоксичностью и высокой биосовместимостью, поскольку они наносятся на поврежденную кожу с нарушенной барьерной функцией. Оптимальной формой являются легкие альгинатные пленки или тонкослойные гели, которые не вызывают мацерации и легко удаляются. АБП для дерматологического применения должны быть активны в отношении *S. aureus* и одновременно модулировать локальное воспаление. Этим требованиям удовлетворяют человеческие дефензины (hBD-2, hBD-3), которые не только уничтожают бактерии, но и регулируют продукцию провоспалительных цитокинов кератиноцитами. Низкая цитотоксичность и отсутствие сенсibilизации являются обязательными условиями для дерматологических конструкций, что делает пептиды человеческого происхождения предпочтительным выбором.

Обобщая вышеизложенное, можно сформулировать ряд практических рекомендаций для разработки и применения альгинатных систем доставки антибактериальных пептидов.

Скрининг совместимости. На этапе предварительных исследований необходимо проверить, не инактивирует ли альгинатный матрикс или ионы кальция выбранный антибактериальный пептид. Некоторые АБП могут связываться с полимером электростатически, теряя активность, или разрушаться в условиях ионного гелеобразования. Контрольные эксперименты по определению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) пептида до и после контакта с компонентами геля позволяют выявить потенциальные проблемы на ранней стадии.

Оценка кинетики высвобождения. Профиль высвобождения АБП должен моделироваться не в буферных растворах, а в условиях, максимально приближенных к реальной раневой среде. Для хронических ран важны эксперименты с имитацией раневого экссудата (рН 5.5–6.5, присутствие матриксных металлопротеиназ), для ожоговых ран — моделирование условий с высоким содержанием белка. Только такие исследования позволяют приблизиться к прогнозированию реального поведения системы *in vivo*.

Комбинаторная терапия. АБП не следует рассматривать как изолированную замену традиционным антибиотикам. Их наибольший потенциал раскрывается в составе многокомпонентных систем, где АБП выступают в роли мощного дополнения к классическим антибиотикам, факторам роста или противовоспалительным агентам. Такой подход позволяет воздействовать на патологический процесс по нескольким направлениям одновременно.

Обязательным этапом доклинических исследований является **оценка цитотоксичности** АБП в той форме и концентрации, в которой они высвобождаются из геля. Тестирование на культурах человеческих фибробластов и кератиноцитов позволяет определить терапевтическое окно — диапазон концентраций, в котором пептид эффективен против бактерий, но не токсичен для собственных клеток организма. При прочих равных условиях предпочтение следует отдавать пептидам человеческого происхождения (LL-37,

дефензины), поскольку они обладают наименьшим иммуногенным потенциалом и эволюционно адаптированы к взаимодействию с клетками человека.

2.4. Бактериолитические ферменты и полимерные системы их доставки как альтернатива традиционным антибактериальным препаратам для лечения инфицированных ран

2.4.1. Энзибиотики как альтернатива антибиотикам

Помимо бактериофагов и АБП ведется активный поиск и других альтернативных лекарственных средств борьбы с патогенными бактериями, отличающихся от традиционных низкомолекулярных антибактериальных препаратов [Theuretzbacher & Piddock, 2019]. Одним из перспективных подходов является терапия бактериальных инфекций с использованием рекомбинантных бактериолитических ферментов или энзибиотиков. Механизм антибактериального действия таких ферментов обусловлен гидролизом различных связей в молекулах пептидогликана (ПГ), входящего в структуру клеточных стенок бактерий, разрушением пептидогликанового слоя, за счёт чего клетка теряет механическую прочность и разрушается под действием внутреннего осмотического давления (Schmelcher, Donovan & Loessner, 2019; Kortright et al., 2019; Heseloth et al., 2021) (рис. 13).

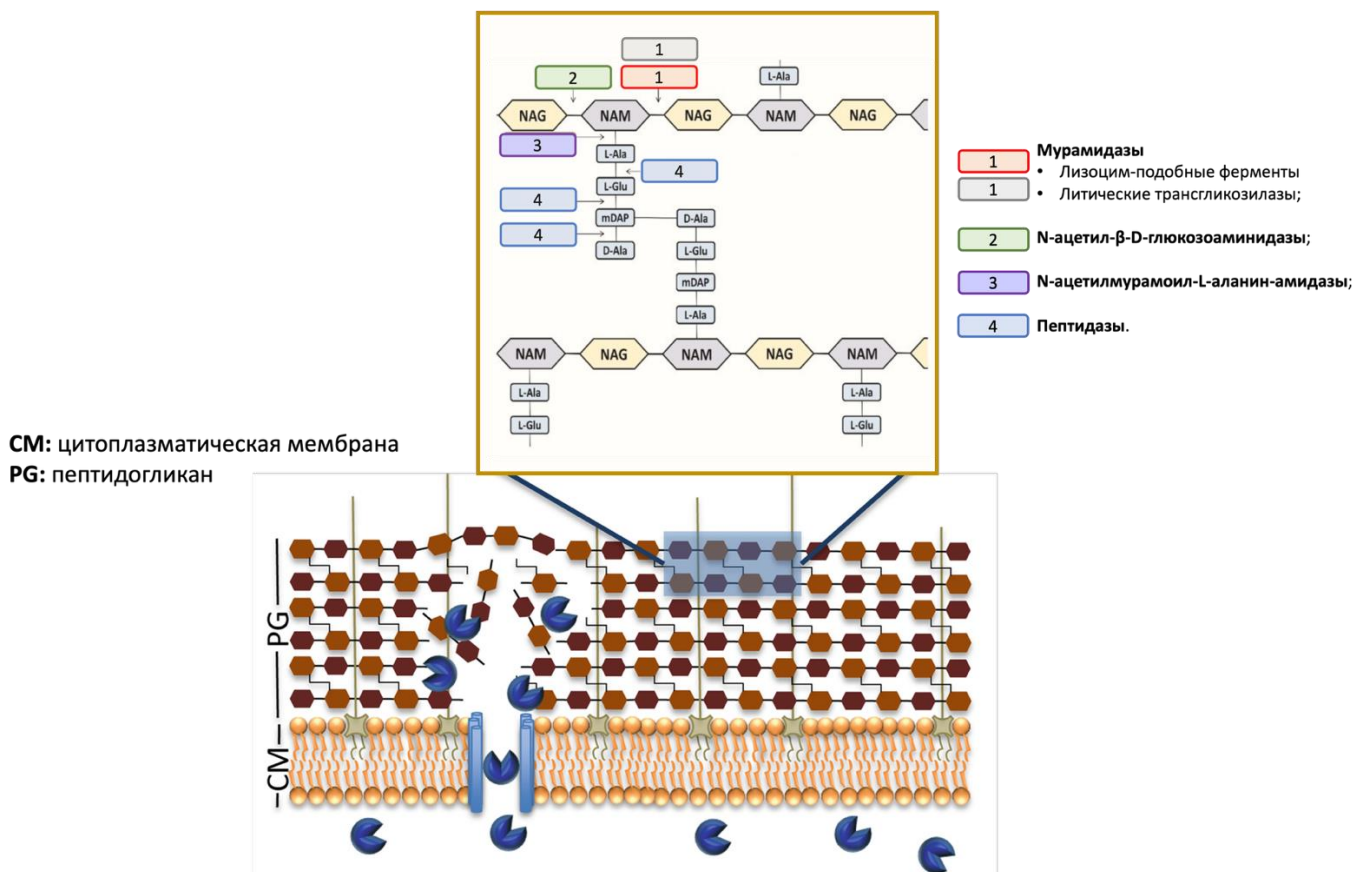


Рисунок 13. Схематическое изображение структуры пептидогликана (ПГ) *S. aureus*, различная специфичность расщепления эндолизинами и упрощённый механизм лизиса, опосредованного холином и эндолизином. (Внизу) Когда достигается критическая концентрация холина, холины деполаризуют цитоплазматическую мембрану (ЦПМ), образуя поры, через которые накопленные в цитоплазме эндолизины получают доступ к пептидогликану. В результате пептидогликан разрушается, клеточная стенка больше не выдерживает внутреннего осмотического давления и в конечном итоге подвергается лизису. (Вверху, на примере ПГ грамтрицательной бактерии) Гликановые цепи состоят из β-1,4-связанных чередующихся мономеров остатков N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) и дополнительно сшиты через короткие пептидные цепочки, присоединённые к остаткам NAM и формирующие пептидный остов ПГ. В случае грамположительных бактерий, например, *S. aureus*, пептидный остов дополнительно может включать межпептидные мостики. Эндолизины можно разделить на несколько групп в зависимости от их специфичности расщепления:

(1) гликозидазы – воздействуют на гликозидные связи, включая N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, N-ацетил-β-D-мурамидазы и трангликозилазы; (2) амидазы – воздействуют на амидные связи, включая N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы; и (3) эндопептидазы – воздействуют на пептидные связи внутри пептидных цепей и межпептидных мостиков.

Основными преимуществами действия энзимбиотиков, как класса антибактериальных агентов, является способность действовать в отношении различных бактерий, независимо от их статуса лекарственной устойчивости, низкая вероятность развития резистентности (благодаря действию на высококонсервативные структуры клетки), низкой вероятности развития нежелательных и аллергических реакций в ответ на применение. Кроме того, способность эндолизинов действовать в отношении бактериальных пленок открывает широкие возможности их применения для профилактики и лечения раневых инфекций, как в качестве самостоятельной, так и дополняющей антибактериальной терапии, например, при инфекциях кожи и мягких тканей, вызванных устойчивыми к стандартной антимикробной терапии бактериями (Danis-Włodarczyk, Wozniak & Abedon, 2021).

Разнообразие белков, рассматриваемых в качестве потенциальных антибактериальных молекул, широко и включает эндолизины бактериофагов, вирион-ассоциированные пептидогликангидролазы (VAPGHs) и лизины хвостового отростка (TAL), бактериоцины (или бактериолизины) и автолизины, лизоцимы из различных источников, а также, в ряде случаев, деполимеразы полисахаридов, которые воздействуют на внеклеточные или поверхностные структуры, такие как капсульные полисахариды бактерий, полисахариды матрикса биопленок или ЛПС (рис. 14).



Рисунок 14. Основные классы энзибиотиков: ферменты фагового происхождения: (1) пептидогликангидролазы (ПГГ), к которым относятся эндолизины и ассоциированные с вирионами пептидогликангидролазы, и (2) ферменты, разрушающие биоплёнки (деполимеразы полисахаридов (ПСД)). Кроме того, среди энзибиотиков выделяют ферменты бактериального происхождения: (3) ферменты, разрушающие биоплёнки; (4) аутолизины, которые представляют собой бактериальные ферменты, расщепляющие пептидогликан для обеспечения разделения дочерних клеток после клеточного деления, и (5) бактериоцины, представляющие собой производимые бактериями антибактериальные белки или пептиды, которые подавляют рост близкородственных бактерий. Более того, к энзибиотикам относятся ферменты животного происхождения, включая (6) лизоцимы, содержащиеся в естественных жидкостях организма, например, в слезах, слюне, молоке и слизи. Кроме того, хотя это и не показано, существуют энзибиотики с противогрибковой активностью, например, грибные эндоглюканы. Стрелки соединяют источники энзибиотиков с их целевыми субстратами.

В то же время, относительно низкая стабильность ферментов может снижать их эффективность и ограничивать спектр применения. В связи с этим при создании препаратов на основе энзимбиотиков важную роль играет подбор вспомогательных веществ, направленный на повышение стабильности, сохранение свойств ферментов. В настоящее время активно изучается возможность применения энзимбиотиков в виде средств для местной терапии – гелей (Vasina et al., 2024a), мазей (Hamed, Awni & Abdulmir, 2023), повязок (Li et al., 2022), капель (Mursalin, 2023) и спреев (Pastagia et al., 2013). Известно, что лизины, особенно модифицированные и активные в отношении Г- бактерий, обладают рядом цитотоксических свойств: антимикробные пептиды могут быть неизбирательны и действовать в отношении мембран не только прокариотических клеток, но и эукариотических (Roach & Donovan, 2015; Dawson & Liu, 2011). Топический путь введения потенциально снижает риск системных побочных эффектов, однако при этом лекарственная форма контактирует с повреждённой кожей, и может потенцировать сенсбилизацию и иммунологические эффекты при кратном нанесении. В литературе описаны результаты по доклинической безопасности отдельных модифицированных эндолизинов в составе геля для местного применения: для геля с LysECD7-SMAP показаны отсутствие системной биодоступности и отсутствие токсических эффектов по результатам исследований общей токсичности, местной переносимости и иммунотоксичности после однократного и многократного нанесения (Antonova et al., 2024). При исследовании иммуногенности эндолизина ClyS в составе жирорастворимой мягкой формы (мази) на протяжении 8 недель нанесения результаты показали низкий титр специфичных антител, не обладающих нейтрализующей активностью [Pastagia et al., 2011]. Для применяемых в практике космецевтических продуктов на основе фагового эндолизина (линейка продуктов Staphefekt) также отмечена гипоаллергенность и безопасность при накожном нанесении (Totté, van Doorn & Pasmans, 2017). Эти результаты подтверждают принципиальную реализуемость безопасных эндолизин-содержащих топических форм.

2.4.2. Разнообразие природных бактериолитических ферментов и механизмов их действия

Источниками бактериолитических ферментов (далее – лизины) могут служить различные организмы, такие как бактерии (например, бактериоцин лизостафин, продуцируемый *Staphylococcus simulans*, автолизины) (Vollmer, Blanot, De Pedro, 2008), бактериофаги (многочисленные эндолизины, VAPGHs, TALs) (Grabowski et al., 2021), позвоночные (лизоцимы различного происхождения) (Callewaert & Michiels, 2010). Все они могут выполнять различные биологические функции, но в большинстве случаев связаны с внутри- и межвидовой конкуренцией организмов и адаптацией к условиям окружающей среды (Do, Page & Walker, 2020).

Лизины достаточно разнообразны по своей каталитической активности. В зависимости от связей в цепях пептидогликана, на которые они действуют, лизины классифицируют в 5 групп (рис. 15): 1,4- β -N-ацетил мурамидазы (лизоцим-подобные ферменты, КФ 3.2.1.17), N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.52) и литические трансгликозилазы (КФ 4.2.2.29), расщепляющие гликозидные связи в гликановой цепи, N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы (КФ 3.5.1.28), гидролизующие амидную связь между гликановой цепью и пептидными мостиками, а также пептидазы (КФ 3.4.-.-), действующие на различные пептидные (амидные) связи в мостиках ПГ (ПГ) (Schmelcher, Donovan & Loessner, 2019).

Химическая структура бактериального пептидогликана относительно консервативна, тем не менее изменения в его составе позволяют группировать бактерии в соответствии с их хемотипами (Vollmer, Blanot, De Pedro, 2008; Schleifer & Kandler, 1972). Хотя гликановые цепи у грамположительных и грамотрицательных бактерий схожи, существуют значимые различия в структуре пептидного остова и сшивок. Это объясняет, почему эндолизины способны специфически разрушать клеточную оболочку филогенетически далеких видов бактерий, действуя на определенные хемотипы ПГ. При этом

стоит отметить, что ферменты, активные в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, характеризуются значимыми различиями в структурной организации и свойствах и, как правило, не обладают перекрестной специфичностью действия. Как указано выше, такая специализация, по всей видимости, обусловлена строением ПГ и клеточных стенок бактерий.

Помимо каталитического домена, отвечающего за гидролитическую деградацию ПГ, лизины часто обладают дополнительными доменами, позволяющими ферментам связываться с поверхностными клеточными рецепторами или встраиваться непосредственно в мембрану (SAR-лизины). Такие модификации наиболее характерны для ферментов, активных в отношении грамположительных бактерий, но встречаются и у действующих на грамотрицательные патогены.

Различия в доменной организации часто отражают потенциальный спектр действия лизинов (рис. 15).

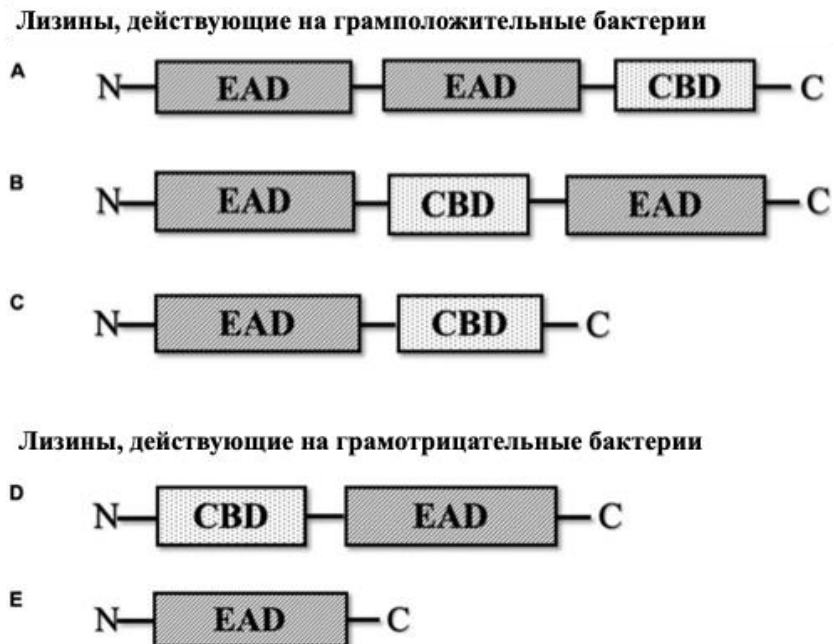


Рисунок 15. Схематическое представление структурной организации лизинов, действующих в отношении грамположительных (A-C) и грамотрицательных бактерий (D и E) (адаптировано из (Wong et al., 2022)). EAD – каталитический

домен, CBD – домен связывания с клеточной стенкой, N - амино-конец полипептидной цепи белка, C - карбокси-конец полипептидной цепи белка.

Так, ферменты, нацеленные на грамположительные бактерии, представляют собой модульные дву- или мультидоменные молекулы с молекулярной массой >25 кДа, состоят обычно из одного или нескольких каталитических доменов (EAD) на N-конце и домена связывания с клеточной стенкой (CBD) на C-конце полипептидной цепи. Лизины, нацеленные на грамотрицательные бактерии, обычно представляют собой небольшие однодоменные глобулярные белки (10-20 кДа), включающие только один каталитический домен (Broendum, Buckle & McGowan, 2018). Однако отдельные ферменты также могут нести CBD на N-конце.

Благодаря CBD, отвечающим за распознавание субстрата и специфичность связывания с бактериальной клеточной стенкой, ферменты, нацеленные на грамположительные бактерии, как правило, имеют более узкий круг чувствительных видов, по сравнению с лизинами, нацеленными на грамотрицательные бактерии (Ajuebor et al., 2016), однако обладают более высокой скоростью действия и меньшей эффективной концентрацией.

На данный момент установлено, что активность не ограничена только непосредственным гидролизом субстрата. В частности, лизины, обладающие активностью в отношении грамотрицательных бактерий, часто содержат в своей последовательности заряженные поликатионные участки, действующие как антимикробные пептиды: они связываются с заряженными молекулами на поверхности клетки (например, ЛПС), обладают пермеабилizующим действием, нарушая структуру внешней мембраны, изменяют ее поверхностный заряд и повышают проницаемость (Sisson et al., 2024).

Таким образом, природное разнообразие ферментов, гидролизующих бактериальный ПГ, очень велико, основная мишень является высококонсервативной бактериальной структурой, а диапазон специфичности их действия может варьироваться от целого рода до конкретного штамма, что

делает их потенциальной привлекательной альтернативой классическим антимикробным агентам для применения в самых различных областях.

2.4.3. Лизоцимы

Среди всех энзимов для выполнения практических задач нами был выбран лизоцим благодаря его высокой антибактериальной эффективности, высокой стабильности, низкой стоимости, хорошей изученности его биологической активности и широкого спектра применения.

Лизоцим (или мурамидаза, или N-ацетилмурамовая кислота гидролаза, Е.С. 3.2.1.17) – это белок, который проявляет свою ферментативную активность за счёт гидролиза β -1,4-гликозидных связей между NAM и NAG в полисахаридном остове ПГ клеточной стенки грамположительных бактерий.

ПГ состоит из полисахаридных цепей, сшитых короткими пептидами. Полисахаридные цепи содержат чередующиеся звенья NAM и NAG. Пептиды связаны с лактатным остатком NAM и обычно состоят из L-аланина, D-изоглутаминовой кислоты (D-изоглутамин у многих грамположительных бактерий), L-Lys или мезо-диаминопимелиновой кислоты (у грамположительных и грамотрицательных бактерий соответственно) и двух остатков D-Ala. Боковые пептидные цепи разных полисахаридных цепей соединяются друг с другом либо прямой связью между мезо-пимелиновой кислотой и первым D-Ala (у грамотрицательных бактерий), либо через поперечный мостик (у грамположительных бактерий) — пептид, характерный для каждого вида.

Благодаря своей способности разрушать бактериальную клеточную стенку, лизоцим считается эндогенным антибиотиком, имеющим врожденное значение для защиты от микробов с момента его открытия А. Флемингом в 1921 году. Лизоцим представляет собой небольшой мономерный белок, стабилизированный четырьмя дисульфидными связями между восемью остатками цистеина в его цепи (рис. 16).

Воздействие на грамотрицательные бактерии значительно слабее из-за наличия защитного липополисахаридного слоя на внешней мембране.

Было предложено и успешно разработано множество физических и химических методов, направленных на повышение восприимчивости грамотрицательных бактерий к лизоциму.

Учитывая хорошо известную антибактериальную, противовирусную, противогрибковую, противовоспалительную, противораковую и иммуномодулирующую активность, лизоцим широко применяется как в медицине, так и в ветеринарии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве для борьбы с различными патогенными микроорганизмами (Ferraboschi et al., 2021).

2.4.4. Основные направления применения энзибиотиков

В первую очередь энзибиотики рассматриваются к использованию там, где растущая устойчивость бактерий к антибиотикам приводит к повышению летальности инфекционных заболеваний у человека. Потенциально к таким инфекциям относятся инфекции сердечно-сосудистой системы (бактериемии, эндокардиты), респираторные инфекции (пневмонии), инфекции центральной нервной системы (менингит и абсцессы головного мозга), ушные и глазные инфекции (например, отит и кератит), инфекции кожных структур и мягких тканей (в том числе раневые и ожоговые), инфекции костей и суставов, инфекции мочевыводящих путей.

Одним из наиболее распространенных в этиологической структуре инфекционных заболеваний патогенов является золотистый стафилококк, штаммы которого часто несут гены устойчивости к антибиотикам, а основное беспокойство системы здравоохранения связано с метициллин-устойчивыми штаммами (например, MRSA) и штаммами с множественной резистентностью. Бактериолитические ферменты в качестве лекарственных препаратов получили наибольшее развитие именно для лечения стафилококковых инфекций, как локальных, так и системных. Несмотря на множество примеров эндолизиннов, находящихся на различных этапах разработки, в клинических исследованиях

находятся лишь несколько препаратов. Эндолизин CF-301 в виде препарата Eхеbacase прошел I и II фазы клинических испытаний при лечении бактериемии, вызванной *S. aureus*, в том числе и эндокардита, в дополнении к антибиотику – стандарту лечения. Данный препарат стал первым препаратом на основе фагового лизина, допущенным к клиническим исследованиям (Fowler et al., 2020). Препарат LMN-201, содержащий генно-инженерный эндолизин, проходит клинические исследования для перорального лечения инфекционного колита, вызванного *Clostridium difficile* (WHO, 2023). Эндолизин Staphefekt™ в составе препарата Gladskin доступен для использования при инфекционном атопическом дерматите, в случаях, если возбудителем является золотистый стафилококк. В ходе клинических испытаний была доказана его эффективность при местном применении для снижения бактериальной обсемененности кожи, а также уменьшения симптоматики дерматита, хотя данный препарат является косметическим, а не лекарственным (Totté, van Doorn & Pasmans, 2017). Корейский препарат N-Rephasin® SAL200 (компания Intron Biotechnology) является ГЛФ, содержащей рекомбинантный эндолизин SAL-1, обладающий антистафилококковой активностью. Этот препарат показал высокую активность *in vitro*, а также эффективность на животной модели бактериемии. Более того, доклинические исследования безопасности при однократном или многократном внутривенном применении на собаках показали, что это препарат не обладает токсичным действием и безопасен. На основании этих данных SAL200 в виде препарата LSVT-1701 (tonabacase) был переведен на I фазу клинических исследований на здоровых добровольцах, в ходе которой были изучены фармакокинетика, фармакодинамика, безопасность и иммуногенность препарата (Kushwaha et al., 2024). Фаза IIa клинических исследований по изучению эффективности и безопасности препарата по показанию бактериемия, вызванная *S. aureus*, была досрочно завершена без оглашения результатов, по причине спонсорского решения, не связанного с какими-либо проблемами безопасности препарата (WHO, 2021).

Таким образом, в настоящий момент в клинических исследованиях (зарубежных) или в продаже представлено ограниченное количество препаратов на основе литических ферментов. Показаниями к их применению являются местные или системные инфекционные заболевания, вызванные грамположительными бактериями *S. aureus*. При этом из литературы известно, что эндолизины, активные в отношении грамположительных бактерий, часто не обладают широким спектром действия, и способны эффективно действовать только на бактерии в пределах рода, а иногда даже вида или определенных штаммов, за счёт наличия в структуре дополнительного структурного домена, обеспечивающего взаимодействие со специфическими рецепторами на поверхности клеточной стенки бактерии (Oliveira et al., 2013; Low et al., 2011).

В то же время для эндолизинов, действующих против грамтрицательных видов бактерий, показан гораздо более широкий спектр активности (Murray, E. et al., 2021). Относительно небольшое количество проектов, связанное с рекомбинантными лизинами против грамтрицательных бактерий, обусловлено трудностью преодоления непроницаемой внешней мембраны этих патогенов, что отложило развитие данного направления на несколько лет по сравнению с эндолизинами против грамположительных патогенов (Gutiérrez & Briers, 2021).

Доклинические исследования эффективности различных ферментов на модельных инфекциях животных получили гораздо более широкое распространение. Например, внутривенное применение фермента PlyF307 способствовало увеличению выживаемости мышей, зараженных *A. baumannii*, в эксперименте, моделирующем сепсис (Lood et al., 2018). Говоря про возбудителей пневмонии, эндолизин Cpl-1 при парентеральном применении в животных моделях инфекций показал свою эффективность в отношении *Streptococcus pneumoniae*, являясь перспективной молекулой для дальнейших разработок лекарственных препаратов (Loeffler et al., 2003). Модифицированный фермент LysECD7-SMAP значительно увеличивал выживаемость животных в моделях сепсиса и пневмонии, вызванных *K. pneumoniae* (Vasina et al., 2024b). При остеомиелите (Jayakumar et al., 2021), инфекционном артрите (Ferry et al.,

2021), имплант-ассоциированных инфекциях (Fursov et al., 2020) также возможно парентеральное введение лизинов в область, зараженную бактериями, что приводит к снижению количества или полной элиминации патогенов.

Однако системное применение бактериолитических ферментов может иметь ряд ограничений, таких как короткий период полувыведения и иммуногенность. В связи с чем одним из наиболее перспективных направлений является их применение для лечения местных инфекций. Особенную роль здесь играет высокая эффективность лизинов в деградации трехмерных бактериальных биопленок, которые зачастую ассоциированы с затяжным течением инфекционного процесса (Iaconis et al., 2024). Например, эндолизины PlyPa03 и PlyPa91 значительно снижали количество *P. aeruginosa* в инфицированных ранах мышей (Raz et al., 2019), а MR-10 значительно снижал бактериальную нагрузку, ускорял ранозаживление и разрушал формирующиеся биопленки *S. aureus* в ожоговой модели (Chopra, Harjai & Chhibber, 2016).

Потенциал медицинского применения бактериолитических ферментов не ограничивается непосредственным созданием лекарственных и косметических препаратов. Отдельного упоминания заслуживает обработка абиотических поверхностей для удаления биопленок, например, катетеров, имплантатов или медицинских аппаратов, таких как ингаляторы или аппараты для искусственной вентиляции легких, так как они могут быть источниками внутрибольничных патогенов с МЛЮ (Rodríguez-Rubio et al., 2016).

Применение лизинов имеет потенциал и в ветеринарном секторе, так как они эффективны и против возбудителей инфекций животных (*Salmonella* sp, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus suis*, *Bacillus anthracis* и другие) (Rodríguez-Rubio et al., 2016). Кроме того, в пищевой промышленности эти ферменты могут использоваться для контроля бактериального поражения продуктов растительного и животного происхождения такими бактериями, как сальмонеллы, листерии и др. (Wang, Zhao & Wang, 2023; Santos et al., 2026; Han et al., 2022).

2.4.5. Направленная инженерия бактериолитических ферментов

Закономерно, развитие технологии энзимбиотиков как антибактериальных агентов началась с ферментов, активных в отношении грамположительных микроорганизмов. Это объясняется доступностью ПГ, локализованного на поверхности бактериальной клетки, и, как следствие, более простым механизмом действия непосредственно снаружи клетки. Однако сейчас все чаще внимание исследователей привлекают и ферменты, активные в отношении грамотрицательных бактерий, для чего активно применяются методы генетической инженерии с целью получения белков с заранее заданными свойствами.

Рациональный дизайн молекул и модификации белковых последовательностей методами генетической инженерии позволяет повысить активность в отношении грамотрицательных бактерий за счёт введения дополнительных пермеабилзирующих доменов или гибридизации нескольких разных каталитических доменов в одной белковой молекуле, а также создать химерные молекулы с необходимыми биотехнологическими свойствами (Aitken et al., 2025).

Например, для увеличения антибактериальных свойств ферментов, активных в отношении грамотрицательных бактерий, в структуру белка вводят положительно заряженные или амфифильные пептиды. Положительный заряд пептида нейтрализует отрицательно заряженные молекулы липополисахарида наружной мембраны бактерий, приводя к ее дестабилизации, что позволяет модифицированному ферменту эффективно проникать к целевому субстрату – ПГ. Так, генетическая гибридизация эндолизина LysECD7 с фрагментом антимикробного пептида SMAP-29 привела к значительному увеличению антибактериальных свойств (снижение эффективных дозировок, расширение спектра действия, эффективность в различных условиях среды) (Vasina et al., 2024б). Существуют целые библиотеки (например, VersaTile), позволяющие подобрать сочетание пептидов, EAD и CBD, исходя из поставленных задач и

основываясь на рациональном подходе к получению химерных белков (Duyvejonck et al., 2021). Для борьбы с внутриклеточными формами патогенов (например, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) исследователи рассматривают модификацию лизинов с использованием ряда пептидов (например, интернализуемых пептидов (cell-penetrating peptides)), позволяющих ферменту проникнуть и реализовывать антибактериальное действие внутри эукариотической клетки (Röhrig et al., 2020).

Широко распространена гибридизация нескольких нативных доменов (как связывающими клеточную стенку, так и каталитическими) в одну синтетическую последовательность лизина, а также замена одних доменов на другие для изменения специфичности действия молекулы или увеличения ее активности. Известен целый ряд химерных молекул, в которых CBD был взят от одного фермента, а EAD от другого (P128, SA.100, CL7 и другие) (Zhang et al., 2026). Более того, возможно удаление целиком отдельных доменов связывания, что зачастую позволяет расширить спектр действия фермента. Такой эффект был показан, в частности, для антистафилококкового эндолизина LysK (Horgan et al., 2009).

Кроме того, направленная модификация лизинов помогает преодолеть или значительно нивелировать и некоторые другие недостатки энзимбиотиков, например, повысить стабильность ферментов в условиях организма, изменить фармакокинетические свойства при применении *in vivo*. Так, добавление в структуру альбумин-связывающих пептидов, доменов димеризации или удаление Т-клеточных эпитопов позволяет увеличить период полувыведения фермента из кровотока при внутривенном применении, например, для лечения бактериемий (De Maesschalck et al., 2020).

2.4.6. Применимость бактериолитических ферментов в альгинатных системах

Создание гелевых и гидрогелевых форм для локальной доставки литических ферментов представляет собой перспективное направление, однако требующее особого подхода к выбору полимерной матрицы. Для обеспечения необходимых реологических свойств и активности действующего вещества для

успешного применения таких средств, важно подобрать оптимальный гелеобразователь. В случае бактериолитических ферментов это могут быть полисахаридные полимеры, совместимые с белковой природой действующего вещества и характеризующиеся хорошей биосовместимостью и безопасностью при попадании в окружающую среду (Ozdil & Aydin, 2014). В частности, такими полимерами могут служить природные альгинаты, обладающие высокой способностью к водопоглощению и достаточно доступные в промышленных масштабах (Abdulsalam et al., 2025; Ren et al., 2024). Полианионная природа альгинатов обеспечивает несколько ключевых преимуществ для доставки катионных эндолизин (Angra et al., 2021). Отрицательно заряженные карбоксильные группы образуют рН-чувствительные связи с положительно заряженными участками лизина, что особенно важно для контролируемого высвобождения фермента в условиях изменяющегося рН раневой среды. Гидроксильные группы моносахаридных единиц создают гидрофильное окружение, способствующее сохранению нативной конформации белка.

Существующие примеры формулирования литических ферментов в местные лекарственные формы наиболее широко представлены для ферментов, действующих в отношении *S. aureus*. Например, эндолизин LysGH15, совместно с противовоспалительным флавоноидом апигенином, включали в состав смягчающей мази Aquaphor (включающей вазелин, минеральное масло, церезин, ланолиновый спирт, пантенол, глицерин и бисаболол) для лечения раневых инфекций (Cheng et al., 2018). Другим примером является бактериоцин лизостафин, который формулировали в гель с полиэтиленгликолем для лечения имплант-ассоциированных инфекций (Johnson et al., 2018), в антимикробный гель на основе хитозана (Nithya et al., 2018) и в наноэмульгель (Nour El-Din et al., 2020) и в форме частиц биоактивной силикатной керамики на основе диопсида (Kudinova et al., 2023).

Введение альгинатов в состав полимерных матриц, используемых в качестве материалов покрытий для ранозаживления, позволяет эффективно инкорпорировать в матрикс и осуществлять дозированное высвобождение из

него лекарственных или биологически активных веществ, а также может служить подложкой для клеток. Мономеры маннуриновой и гулуриновой кислот, составляющих химическую структуру альгинатов, несут отрицательно заряженные карбоксильные группы (за счёт сшивки которых двухвалентными катионами металлов, таких как ионы кальция, формируется гидрогель), что дает возможность для эффективной инкапсуляции положительно заряженных литических ферментов. Удерживание лизоцимов в альгинатном гидрогеле за счёт ионных связей обеспечит их пролонгированное высвобождение. Бактериальные альгинаты могут явиться интересной альтернативой распространённому и одобренному для применения в составе медицинских изделий водорослевому альгинату, т.к. возможность регуляции их свойств при биосинтезе позволяет контролировать кинетику высвобождения загруженных в гидрогели биоактивных веществ.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные молекулы-мишени энзимотиков в бактериальной клетке и окружающей ее среде.
2. На какие связи внутри пептидогликана действуют ферменты и к каким классам относятся эти белки?
3. Какие основные структурные домены выделяют у лизоцимов?
4. Почему пептидогликангидролазы считаются перспективной альтернативой классическим антимикробным препаратам?
5. Каковы особенности аминокислотной последовательности лизоцимов, которые определяют их ферментативную активность?
6. Перечислите характерные особенности литических ферментов, действующих в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.
7. Какие подходы используются для улучшения свойств ферментов?
8. В каких областях могут быть использованы бактериолитические ферменты?

Темы для рефератов

1. Разнообразие и функции бактериолитических ферментов в природе.
2. Существующие классы и механизмы действия бактериолитических ферментов.
3. Действие бактериолитических ферментов в отношении бактериальных биопленок.
4. Применение бактериолитических ферментов в биомедицинских исследованиях. Антибактериальные покрытия и материалы с энзимбиотиками.
5. Потенциал применения бактериолитических ферментов в пищевой промышленности.

Глава 3. Практикум «Исследование формирования и свойств альгинатного гидрогеля для доставки бактериолитических ферментов, используемых для лечения инфицированных ран»

3.1. Теоретическое введение

3.1.1. Гидрогели и альгинатный гель как их представитель: классификация и структура

Гидрогели являются составляющими уже существующих биоинженерных конструкций, применяемых в регенеративной медицине, в частности, в качестве раневых покрытий и систем для контролируемой доставки гидрофильных терапевтических агентов, а также рассматриваются для разработки новых.

В зависимости от механизма сшивания все гидрогели можно разделить на два основных класса: *необратимые (ковалентные)* и *обратимые (физические)*. К первому классу относятся гели, формирующиеся за счёт прочных ковалентных связей между полимерными цепями; их образование практически необратимо. Типичным примером служит полиакриламидный гель, широко используемый в электрофорезе. Ко второму классу принадлежат гели, структура которых стабилизирована более слабыми физическими взаимодействиями, что делает процесс гелеобразования обратимым. Рассмотрим их подробнее.

Среди физических гелей можно выделить несколько групп, исходя из природы взаимодействий между полимерными цепями. Назовём наиболее распространённые из них. Для термообратимых гелей фактором, определяющим фазовый переход раствор-гель, является температура. Среди них можно выделить две основные подгруппы. Одни, такие как желатин или агароза, образуются при охлаждении раствора за счёт конформационного перехода полимерных цепей из состояния беспорядочного клубка в спиральные структуры с их последующей супрамолекулярной ассоциацией в узлы сети. Другие, например поли-N-изопропилакриламид, напротив, гелируются при нагревании.

Это обусловлено наличием нижней критической температуры смешения (32–35°C для поли-N-изопропилакриламида): ниже неё полимер растворим благодаря водородным связям с водой, выше — эти связи разрушаются, а усиливающиеся с ростом температуры гидрофобные взаимодействия между изопропильными группами становятся доминирующими, что приводит к потере растворимости и обратимому гелеобразованию.

Криогели — отдельный подкласс физических гелей, получаемых циклами замораживания-оттаивания. Несмотря на температурную зависимость, механизм формирования криогелей принципиально отличается от классических термообратимых гелей, в связи с чем их выделяют в отдельную группу. В криогелях ключевую роль играет криоконцентрирование полимера в незамёрзших микрообъёмах и последующая кристаллизация цепей, формирующая макропористую структуру. Классическим примером служат гели на основе поливинилового спирта.

Аффинные (биоспецифические) гели образуются за счёт обратимого молекулярного узнавания между комплементарными парами, например лектином (белком, способным высокоспецифично связывать остатки углеводов) и гликозилированным полимером (система конканавалин А — поли-N-(2-D-глюкоз)акриламид) (Versea & Luri, 2024). Такие гели способны к обратимому фазовому переходу при добавлении конкурентного лиганда (свободной глюкозы).

Ионотропные гели, которые более подробно будут рассмотрены ниже, формируются при введении в раствор ионизированного полимера многовалентных ионов противоположного знака; классические примеры — альгинат кальция (полианион + Ca^{2+}) и хитозан, сшитый триполифосфатом (TRP^{3-}): поликатион + TRP^{3-} .

Существуют и другие группы физических гелей, например, **кристаллизационные** (Liu et al., 2025), к которым можно отнести и уже упомянутый гель на основе поливинилового спирта (он одновременно относится и к криогелям, что лишний раз демонстрирует условность любых

Предполагаемая вторичная структура последовательности ММГГМ. Как видно М мономеры между собой формируют плоские (горизонтальные) связи, в то время как Г мономеры между собой, так и между М мономерами, формируют зигзагообразные структуры. в) Альгинатная цепь, состоящая из трёх разных типов блоков: М-блок (только из М мономеров), Г-блок (только из Г мономеров), МГ-блок (М и Г мономеры) [Акулина, 2025].

Ключевыми параметрами, определяющими свойства альгината, являются соотношение М/Г блоков, молекулярная масса и чередование мономеров вдоль цепи. М-последовательности образуют более плоские и гибкие участки, в то время как Г-блоки формируют жёсткую, складчатую конформацию. Именно эта зигзагообразная структура Г-блоков создаёт стереохимически оптимальные сайты для координации ионов двухвалентных металлов, что является фундаментом для гелеобразования путём формирования структур, названных в классической работе Гранта и соавторов «egg-box» («яичная коробка») (Grant et al., 1973). Таким образом, вторичная структура полимера напрямую определяет его функциональные характеристики — от вязкости растворов и кинетики гелеобразования до способности к набуханию (Сао et al., 2020).

Коммерчески доступные альгинаты выделяют из некоторых видов бурых водорослей. Кроме того, в лабораторных условиях получают бактериальные альгинаты, которые отличаются от аналогов растительного происхождения возможным ацелированием гидроксильных групп, как показано на рисунке 176.

В пищевой промышленности в качестве загустителей и стабилизаторов предпочитают использовать альгинат с высоким содержанием М-блоков, образующий мягкие, эластичные и упругие гели. Для биомедицинских применений (например, клеточной инкапсуляции, раневых покрытий), где требуется стабильный гель, не склонный к набуханию и сохраняющий свою структуру в физиологических растворах, используют альгинат с высоким

содержанием Г-блоков. Такие гели характеризуются относительно высокой жёсткостью, но при этом являются более хрупкими.

Альгинаты, получаемые из природного сырья – морских бурых водорослей, на данный момент одобрены для медицинского применения, их широко используют в исследованиях в качестве биополимерных носителей для доставки и контролируемого высвобождения биологически активных соединений и белков (Kothale et al., 2020). Минусом является то, что водорослевый альгинат добывается в природных условиях, и его выработка и характеристики в первую очередь зависят от сезона и условий произрастания водорослей. Существуют компании (например, FMC Corporation (США) и Novamatrix (Норвегия)), которые контролируют состав выделенных из водорослей альгинатов (например, путем сбора водорослей разных видов и из разных регионов), однако вариабельность характеристик альгинатов невелика и сложно поддается контролю, а стоимость альгинатов медицинского назначения высокой степени очистки составляет 150 евро за 1 г (<https://novamatrix.biz/#ourproducts>). Таким образом, технология сбора водорослевых альгинатов и их переработки ограничивают получение препаратов с заданными характеристиками для биомедицинского применения вне зависимости от условий окружающей среды.

При покупке стандартного коммерческого альгината из бурых водорослей зачастую нельзя быть уверенным, к какому типу он относится, если нет соответствующей спецификации от производителя и соотношение М/Г не указано прямо или через содержание гулуруновой кислоты (%Г). Однако, если для решения ваших задач необходимо выбрать альгинат с определёнными свойствами, их можно «предугадать» по ряду признаков. Часто альгинат с высоким содержанием Г-блоков маркируется как «высокоочищенный». Большое значение имеет вид водоросли, из которой выделен альгинат, и даже то, из какой части растения он получен. Высокое содержание Г-блоков характерно для ламинарий, особенно для стеблевой части *Laminaria hyperborea*. Высокое содержание М-блоков характерно для водорослей рода Макроцистис

(*Macrocystis pyrifera*) или Аскофиллума (*Ascophyllum nodosum*). Кроме того, показано, что содержание М- и Г- блоков может меняться в зависимости от возраста растения (Haug et al., 1974). Поэтому, очевидно, что свойства коммерческого альгината могут заметно отличаться от партии к партии.

Другой фактор, существенно влияющий на гелеобразование – это молекулярная масса альгината. Для альгината из водорослей — это сильно переменный параметр, который зависит не столько от вида растения, сколько от условий роста, сезона сбора, части слоевища. Важно также, каким методом проведена экстракция и последующая обработка. Коммерческие производители часто проводят контролируемую деполимеризацию, чтобы получить альгинат с заданным диапазоном вязкости и молекулярной массы для конкретных применений.

Перспективным подходом для получения альгинатов с заданной молекулярной массой и соотношением мономеров М/Г является биотехнологический способ получения бактериальных альгинатов. Способностью к синтезу альгината являются бактерии родов *Azotobacter* и *Pseudomonas* (Hay et al., 2013; Abourehab et al., 2022; Guo et al., 2026). При этом, получение альгинатов в процессе направленного биотехнологического синтеза бактериями рода *Azotobacter* представляется потенциально наиболее выгодным и экономически целесообразным, при условии тщательной характеристики свойств продуцируемых препаратов и гелей на их основе. Условия культивирования позволяют оказывать влияние на состав и соотношение мономеров, молекулярную массу бактериального альгината, степень ацетилирования, получая альгинаты со стабильными необходимыми реологическими свойствами в зависимости от цели их применения (Бонарцева и др., 2017; Dudun et al., 2021; Дудун и др., 2024). К тому же бактериальный альгинат, в отличие от водорослевого, может быть ацетилирован в процессе биосинтеза, что так же влияет на свойства полученного полимера. Степень этого влияния до конца не изучена, но считается, что ацетилирование делает кальциевые гидрогели более мягкими в сравнении с не ацетилированными

полимерами (Schandl et al., 2025). При очистке и выделении бактериальный альгинат разделяется на две фракции: низкомолекулярный альгинат (молекулярная масса ниже 150 кДа), не способный к образованию устойчивых гидрогелей, и капсульный альгинат (образующий капсулу вокруг бактериальной клетки). Такой процесс очистки позволяет получать альгинат с меньшим разбросом молекулярной массы (Бонарцева и др., 2017). Таким образом, за счёт варьирования технологических условий ферментации возможно получать широкую линейку марок альгинатов, применимых для разных задач медицины и фармакологии.

Ионные взаимодействия, лежащие в основе **формирования альгинатного геля**, являются быстрым процессом. При контакте капли раствора альгината натрия с раствором, содержащим ионы кальция (Ca^{2+}), в её поверхностном слое происходит практически мгновенное гелеобразование. Это происходит благодаря образованию ионных (координационных) связей между отрицательно заряженными карбоксилатными группами полимера и многовалентными катионами кальция, которые выступают в роли сшивающих агентов. Формирующаяся при этом плотная полимерная сетка замедляет дальнейшую диффузию ионов по сравнению с их движением в свободном растворе. Последующее проникновение гелеобразования вглубь капли (её объёмное отверждение) контролируется кинетикой диффузии ионов Ca^{2+} через уже образовавшийся гелевый барьер.

3.1.2. Синерезис

Высокая скорость формирования геля и направленность процесса от периферии к центру приводят к возникновению явления **синерезиса** – самопроизвольному уплотнению геля, сопровождающемуся выделением жидкости из его пор. При этом изменяется геометрия геля и уменьшается его объём. Данное явление обусловлено тем, что при быстром гелеобразовании полимерные цепи фиксируются в неравновесном, растянутом состоянии. Со временем цепи стремятся реорганизоваться и образовать более плотные

контакты друг с другом, что приводит к сжатию всей сетки и вытеснению части растворителя из пор.

Интенсивность синерезиса зависит от ряда факторов. Чем выше исходная концентрация альгината, тем плотнее формирующаяся полимерная сетка и тем меньше у неё возможностей для последующего сокращения; соответственно, синерезис выражен слабее. Существенное влияние оказывают также условия проведения реакции. рН среды определяет степень диссоциации карбоксильных групп альгината: при значениях рН выше 5 (то есть выше рКа карбоксильных групп, составляющего 3,5–4,0) практически все карбоксильные группы ионизированы, и дальнейшее повышение рН уже не влияет на этот процесс. Ионная сила раствора влияет на электростатические взаимодействия между полимерными цепями, экранируя их заряды и тем самым изменяя конформацию цепей и структуру формирующегося геля.

Важными параметрами являются скорость взаимодействия альгината с ионами кальция и концентрация самих сшивающих ионов. Чем быстрее формируется гель, тем более неравновесной получается структура и тем сильнее выражен последующий синерезис. Для управления этим процессом на практике используют контролируемую подачу ионов кальция, например, применяя нерастворимые соли кальция (карбонат или сульфат) в сочетании с медленно гидролизующимся глюконо- δ -лактоном, что обеспечивает равномерное и постепенное высвобождение ионов-сшивателей по всему объёму (Kuo & Ma, 2001).

Процесс синерезиса протекает во времени — от нескольких минут до часов или даже дней — и имеет разную степень выраженности на разных этапах. Скорость его протекания и полнота зависят от того, как долго в геле присутствуют свободные ионы кальция: чем дольше гель контактирует с раствором сшивающего агента, тем больше степень сшивки и тем сильнее проявляется последующая усадка. Удаление избыточных ионов кальция путём отмывки останавливает дальнейшее сшивание и тем самым ограничивает развитие синерезиса.

В свободном объёме (например, в гелевой сфере) синерезис протекает изотропно — усадка происходит равномерно во всех направлениях. Однако характер усадки меняется, когда гель сформирован в контакте с твёрдой поверхностью. При этом адгезия материалов должна быть достаточной, чтобы предотвратить отслаивание геля от подложки в процессе усадки. Если гель сформирован внутри пористого объёмного каркаса, его объём остаётся практически неизменным, поскольку заполняющий поры гель за счёт адгезии прочно связан со стенками. Это взаимодействие препятствует свободному сокращению материала, и возникающие при синерезисе внутренние напряжения не могут реализоваться в виде макроскопической усадки.

В данной практической работе гель формируется на пористой подложке, толщина которой на порядок меньше толщины самого геля. В такой системе подложка не может играть роль объёмного каркаса, но выступает как армирующий слой, ограничивающий подвижность геля в латеральном направлении. В результате вместо изотропной усадки наблюдается анизотропный синерезис: гель свободно сокращается перпендикулярно плоскости подложки, что проявляется как уменьшение толщины слоя, тогда как его площадь сохраняется практически неизменной. Это удобно для экспериментов, где важна стабильность геометрических размеров основания образца.

3.1.3. Инкапсулирование белков в альгинатный гель

Для очищенного альгината характерна высокая биосовместимость, которая в сочетании со способностью к ионообменному взаимодействию делает его привлекательной основой для создания систем доставки биологически активных молекул. При физиологических значениях pH отрицательно заряженная матрица альгинатного геля способна электростатически связывать положительно заряженные соединения и затем постепенно высвобождать их по мере диффузии или обмена ионами с окружающей средой. В рамках данной работы это свойство исследуется на примере связывания и высвобождения модельных белков, в качестве которых выбраны два белка куриного яйца с

принципиально различными электростатическими свойствами: *овальбумин* (UniProt P01012) и *лизоцим* (UniProt P00698).

Овальбумин – глобулярный белок, со средней молекулярной массой около 42,9 кДа. Его изоэлектрическая точка находится в кислой области (4,5–4,7). Это означает, что в условиях нейтрального или физиологического pH (7,0–7,4) овальбумин приобретает суммарный отрицательный заряд, становясь полианионом. Напротив, *лизоцим* представляет собой компактный глобулярный белок с молекулярной массой приблизительно 14,3 кДа. Его наиболее важной для данного эксперимента характеристикой является высокое значение изоэлектрической точки (pI), которое составляет около 10,7–11,0. Следовательно, при тех же нейтральных значениях pH, при которых формируется альгинатный гель, лизоцим несёт выраженный суммарный положительный заряд, выступая в роли поликатиона.

Для того чтобы более детально рассмотреть характер взаимодействия белков с альгинатным гелем, недостаточно знать только знак их суммарного заряда — важно также понимать, насколько плотно этот заряд распределён, то есть какова удельная плотность заряда, приходящаяся на единицу массы белковой глобулы. Чтобы это оценить, мы провели расчёт суммарного заряда лизоцима и овальбумина при физиологическом значении pH 7,4, опираясь на их аминокислотный состав. При этом мы исходили из того, что для приблизительной оценки можно не учитывать тонкости пространственной укладки цепи: заряженные аминокислоты, как правило, выходят на поверхность глобулы и потому доступны для взаимодействия. Величина заряда каждой ионизируемой группы рассчитывалась по уравнению Гендерсона-Хассельбаха (4) с учётом её pKa.

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \lg \frac{[\text{Акцептор протонов}]}{[\text{Донор протонов}]} \quad (4)$$

Для остатков с pKa, значительно отличающимися от pH среды (аргинин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, а также С-концевая карбоксильная группа), заряд принимался как целое число (+1 или –1). Для остатков, чьи pKa близки к физиологическому значению, заряд рассчитывали по

уравнению Гендерсона-Хассельбаха: для N-концевой аминогруппы (pKa ~8,0) он составил +0,8, для гистидина (pKa ~6,0) — примерно +0,04.

У овальбумина положительный вклад дают пятнадцать остатков аргинина, двадцать остатков лизина, N-концевая группа и семь гистидинов, что даёт +36,1. Отрицательные вклады дают четырнадцать остатков аспарагиновой кислоты, тридцать три остатка глутаминовой кислоты и C-концевая группа, в сумме –48. Таким образом, его суммарный заряд составляет примерно –11,9, то есть около –12.

У лизоцима положительный вклад дают одиннадцать остатков аргинина, шесть остатков лизина, N-концевая группа и один гистидин — в сумме +18,8. Отрицательный вклад дают семь остатков аспарагиновой кислоты, два остатка глутаминовой кислоты и C-концевая группа, что вместе составляет –10. В итоге суммарный заряд лизоцима при pH 7,4 оказывается около +8,8, то есть примерно +9.

Полученные цифры позволили вычислить удельный заряд — то есть величину заряда, приходящуюся на единицу молекулярной массы белка. Для овальбумина этот показатель составил около –0,3 заряда на килодальтон, что вполне типично для большинства глобулярных белков. Для лизоцима же удельный заряд оказался почти вдвое выше — примерно +0,6 заряда на килодальтон, что указывает на исключительно высокую плотность положительного заряда. Иными словами, лизоцим представляет собой редкий пример белка с экстремально высокой плотностью положительного заряда при физиологическом pH, тогда как величина и знак удельного заряда овальбумина соответствуют параметрам белка со «среднестатистическими» электростатическими характеристиками.

Такой выбор модельных соединений позволяет наглядно увидеть, как заряд влияет на взаимодействие с полианионной матрицей альгината, а значит — на то, каким образом и насколько эффективно белок включается в гель. Добавление каждого из них в раствор альгината натрия до начала гелеобразования приводит к принципиально разным сценариям.

Раствор альгината при нейтральном рН, напомним, ведёт себя как полианион за счёт диссоциированных карбоксильных групп остатков гулуруновой и маннуруновой кислот. Когда в такой раствор попадает овальбумин, его отрицательно заряженная поверхность и отрицательно заряженные цепи альгината отталкиваются друг от друга. Прочных комплексов не образуется — белок остаётся в растворе в виде независимой молекулы. В процессе гелеобразования он пассивно захватывается в формирующихся порах сети, будучи удержанным лишь стерически. Такой белок не связан с матрицей и способен к быстрой, практически полной диффузии из геля в окружающую среду при его помещении в буфер, демонстрируя механизм так называемого «быстрого высвобождения».

В случае с лизоцимом ситуация противоположна. При внесении лизоцима между его положительно заряженными участками и отрицательно заряженными цепями альгината возникает сильное электростатическое притяжение. Это приводит к образованию прочных полиэлектролитных комплексов ещё на стадии раствора. Нередко это приводит к возникновению опалесценции или помутнения раствора — признаку формирования в жидкой фазе надмолекулярных агрегатов. В ходе последующего сшивания ионами кальция лизоцим оказывается не просто механически захваченным в ячейках гелевой сети, а химически интегрированным в её каркас, будучи связанным множеством ионных пар. Такой механизм обеспечивает практически полное удержание белка в геле и крайне медленное его высвобождение в буфер с низкой ионной силой, что моделирует систему пролонгированной доставки.

Сопоставление этих двух белков в одной и той же альгинатной матрице наглядно показывает, как знак и величина заряда определяют судьбу молекулы: от слабого физического удержания до прочного электростатического связывания. А это, в свою очередь, — ключ к созданию материалов с заданным профилем высвобождения.

3.1.4. Растворение альгинатного геля

Для того чтобы оценить эффективность инкапсуляции модельных белков в альгинатный гель, необходимо знать их начальное содержание в гелевой матрице. Это, в свою очередь, требует полного растворения геля и перевода белка в раствор, где его можно будет количественно определить. Ионотропные гели можно рассматривать как равновесные системы, однако в физиологических условиях равновесие сильно смещено в сторону пребывания альгината в фазе твёрдого геля. Чтобы перевести его обратно в растворимое состояние, необходимо сместить равновесие, ослабив ионные взаимодействия, удерживающие полимерную сетку. Сделать это можно двумя принципиально разными способами: либо снизить степень ионизации карбоксильных групп альгината (то есть понизить рН до 3–4), либо удалить из системы ионы-сшиватели, разрушив тем самым ионные мостики между цепями. Теоретически можно было бы попытаться вытеснить кальций, повысив ионную силу раствора, однако на практике простого увеличения концентрации солей недостаточно для того, чтобы «отмыть» уже связавшиеся ионы из плотной гелевой сетки. Поскольку наша цель — исследовать инкапсуляцию белка, мы не можем прибегнуть к подкислению среды: при низких значениях рН белок может денатурировать. Остаётся единственный рабочий путь — удаление ионов-сшивателей с помощью хелатирующих агентов. Наиболее часто для этой цели используют цитрат натрия или ЭДТА. Оба соединения эффективно связывают ионы кальция, причём их хелатирующая способность максимальна в щелочной среде. Работа при рН 8 удобна ещё и тем, что в этих условиях сам альгинат наиболее стабилен (деградация по механизму β -элиминации минимальна), а белки, как правило, тоже сохраняют нативную структуру. ЭДТА при таком значении рН действует даже эффективнее цитрата. В зависимости от размера, формы и структурных особенностей альгината плотный гель (1,5–2%) может растворяться от 15 минут до нескольких часов.

Растворение свободного от белка 1,5% альгинатного геля, как и геля с инкапсулированным овальбумином (0,5 мг/мл), происходит достаточно легко и полностью в среде, содержащей 0,1 М цитрат натрия, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Однако при попытке растворения геля, содержащего лизоцим в той же концентрации, картина принципиально иная: образуется мутный раствор, а его центрифугирование даёт объёмный и плотный осадок (рис. 18). Чтобы понять причину этого явления, необходимо проследить за тем, что происходит с белком на разных этапах — от смешивания до гелеобразования и последующего растворения.

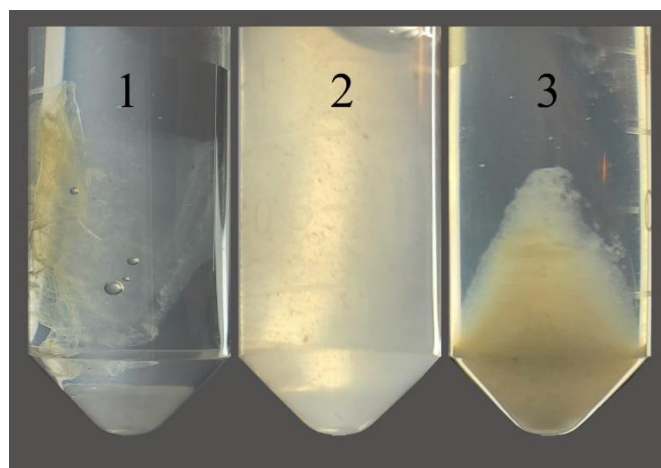


Рисунок 18. Этапы растворения альгинатного геля, содержащего лизоцим. Среда растворения: 0,1М цитрат натрия, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Начало процесса (1) сменяется образованием устойчивой мути через 24 ч инкубации при перемешивании (2); центрифугирование даёт плотный осадок нерастворимых полиэлектролитных комплексов (3).

При смешивании растворов альгината натрия (полианиона) и лизоцима (поликатиона) они действительно притягиваются друг к другу. Однако на этой стадии оба компонента ещё подвижны и находятся в высокогидратированном состоянии. В результате образуются небольшие, относительно стабильные растворимые комплексы или нанокластеры, которые могут давать лёгкую опалесценцию, но не выпадают в макроскопический осадок — система сохраняет динамическое равновесие.

Ситуация меняется в ходе гелеобразования. Когда ионы кальция начинают сшивать альгинатные цепи в жёсткую трёхмерную сетку, лизоцим оказывается зафиксирован в этой сети. Молекулы белка оказываются в тесном контакте друг с другом и с альгинатными цепями, формируя множественные, сверхпрочные связи. Лизоцим теряет подвижность и частично дегидратируется — из индивидуальных гидратированных глобул он превращается в плотно упакованные агрегаты.

Когда на следующем этапе в систему добавляют хелатор (цитрат или ЭДТА), ионы кальция удаляются, и альгинатные цепи начинают высвобождаться из жёсткой сетки. Однако они высвобождаются в среду, где уже присутствуют плотные агрегаты альгината с лизоцимом. Встречаясь с ними, полианионные цепи «налипают» на поверхность белковых кластеров, инициируя лавинообразную, необратимую агрегацию. Образуются крупные, плотные, гидрофобные осадки, устойчивые к дальнейшему растворению, из которых практически невозможно вытеснить воду (Horn, Kapelner & Obermeyer, 2019).

Исключительно высокая плотность положительного заряда на поверхности лизоцима играет особую роль в формировании нерастворимых комплексов. Благодаря этому даже при относительно невысокой молярной концентрации белок способен образовывать множественные ионные контакты с альгинатными цепями, что в условиях гелеобразования приводит к формированию сверхплотных агрегатов, устойчивых к действию стандартных хелатирующих агентов. Для их разрушения требуется комбинированное воздействие, одновременно атакующее все типы связей, стабилизирующих осадок. Прежде всего необходимо повысить ионную силу среды (например, до 1 М NaCl), чтобы ионы натрия и хлора экранировали заряженные группы и конкурировали с ними за электростатические взаимодействия. Для удаления возможных остаточных кальциевых мостиков, которые могут сохраняться внутри плотных агрегатов даже после удаления основного пула ионов, используют хелаторы, например 50 мМ ЭДТА в 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Разрушение водородных связей и гидрофобных взаимодействий,

стабилизирующих как структуру белка, так и его контакты с полимером, достигается добавлением 6 М мочевины. Наконец, в сверхплотных агрегатах не исключено образование межмолекулярных дисульфидных связей, поэтому в буферную смесь вводят восстановитель, например 5% β-меркаптоэтанол. Инкубацию в таком «солюбилизирующем коктейле» проводят при интенсивном перемешивании в течение 12–24 ч.

3.1.5. Определение активности бактериолитических ферментов

Активность ферментов в отношении целевых бактерий является одним из его основных свойств, определяющих дальнейшую применимость и целесообразность разработки. Специфическую активность бактериолитических ферментов можно изучать на различных уровнях: по действию на субстрат, по взаимодействию с структурами инактивированных бактериальных клеток, по интегральному воздействию на живые клетки (антибактериальная активность) и биопленки (противобиопленочная активность). Выбор метода изучения активности зависит от преследуемых целей.

Поскольку, как было указано выше, основным субстратом лизинов является пептидогликан, то активность ферментов часто оценивают по способности гидролизовать этот полимер. К таким методам можно отнести зимографический анализ, являющийся качественной характеристикой энзиматической активности. Он представляет собой разделение растворов ферментов методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, где в состав разделяющего геля добавляют инактивированные бактерии или их изолированный пептидогликан. После электрофореза проводят ренатурацию белков путем удаления додецилсульфата натрия (ДСН) из геля, обеспечивая протекание гидролитической реакции (при наличии), и окрашивают гель специфическим красителем, в ходе чего формируются прозрачные зоны лизиса белковых полос, что свидетельствует об энзиматической активности испытуемого фермента в отношении пептидогликана. Это чувствительный метод, позволяющий детектировать даже слабую гидролитическую активность ферментов (Fukushima & Sekiguchi, 2016).

Антибактериальная активность как результат ферментативной активности белка является наиболее важным показателем потенциала применения ферментов, поскольку позволяет не только количественно охарактеризовать активность, но и изучить спектр действия потенциального препарата в отношении различных видов бактерий. Основным клиническим методом оценки активности антибактериальных агентов, в частности применяемым в качестве диагностического теста оценки чувствительности бактерий к антибиотикам (Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, 2024), служит оценка минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Для определения МИК методом последовательных разведений заданные концентрации антибактериального вещества (чаще всего с двукратным шагом) вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма с определенным содержанием бактериальных колониеобразующих единиц (КОЕ) и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. МИК определяют как минимальную концентрацию антибактериального вещества, подавляющую видимый рост микроорганизма. Известны два основных варианта постановки метода последовательных разведений: в агаре и в бульоне. Метод последовательных разведений в бульоне, в свою очередь, может выполняться в макро- и микро-варианте (в объеме $\leq 0,2$ мл). При этом, именно метод последовательных микроразведений в бульоне является референтным методом определения МИК и регламентируется международным стандартом ISO 20776–1:2019 (ISO 20776–1:2019, 2019). Важно отметить, что этот метод позволяет оценить не только способность подавлять бактериальный рост (т.е. бактериостатическое действие), но и способность уничтожать бактерии, вызывая их гибель (т.е. бактерицидное действие). Для этого высевают микроорганизмы из пробирок с жидкой средой, где ранее была определена МИК, на плотные питательные среды без антибиотика. Выявляют минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) как наименьшую концентрацию, при которой отсутствует

рост бактерий на чашках Петри после инкубации, что свидетельствует о полной гибели клеток.

Кроме того, в литературе распространен метод подсчёта жизнеспособных КОЕ бактерий после инкубации с ферментом, т.е. оценка бактерицидного действия (Schmelcher, Donovan & Loessner, 2019). Этот метод заключается в добавлении различных концентраций фермента к суспензии бактерий, однако, в отличие от стандартизованного метода определения МИК, позволяет варьировать количество бактериальных клеток, время инкубации смесей, а также условия инкубации (например, буферные растворы различного состава, сыворотка крови, питательная среда и др.). После инкубации подсчитывают КОЕ в опытных образцах и сравнивают с контрольными образцами без добавления испытуемых веществ.

Третьим популярным методом является турбидиметрический метод, основанный на оценке снижения оптической плотности, измеряемой при длине волны 600 нм (ОП600), бактериальной культуры при инкубации с ферментом. Этот инструментальный метод позволяет в динамике оценивать снижение мутности, строя кривые лизиса, а также варьировать концентрации фермента, количество бактерий, время и условия инкубации. Кроме того, преимуществом является то, что его можно применить не только в отношении живых бактериальных клеток, но и инактивированных бактерий, а также изолированного пептидогликана – основной мишени литических ферментов, что делает его универсальным для определения как антибактериальной, так и энзиматической активности.

В нашей задаче мы используем один из этих тестов – анализ ПГ-гидролазной активности методом зимографии. Процедура состоит из двух частей: 1) разделение белков (очищенный фермент лизоцим) путем денатурирующего электрофореза в геле, содержащем бактериальный пептидогликан, и 2) гидролиз субстрата ренатурированным ферментом. Оценка активности фермента осуществляется по формированию неокрашенной области в поле окрашенного субстрата при инкубации с красителем. Метод основан на

том, что краситель (метиленовый синий) связывается с отрицательно заряженными группами неразрушенного пептидогликана, окрашивая его в синий цвет, в то время как при расщеплении гликановых цепей под действием лизоцима красителю не с чем связаться, в связи с чем области гидролиза субстрата проявляются в виде четких неокрашенных полос на более темном фоне. Оценка является качественной и позволяет оценить наличие каталитической активности у исследуемого белка. При этом контроль специфичности действия проводится также по соответствию области гидролиза субстрата расчётной молекулярной массе белка.

Цель работы:

Исследовать биоинженерные подходы для инкапсулирования модельных ферментов с бактериолитической активностью, используемых для лечения инфицированных ран, в альгинатные гидрогели и исследовать их высвобождение.

Задачи работы:

- 1) Подготовка установки для заливки пластинок альгинатного гидрогеля и техника внесения армирующей подложки в диализный мешок;
- 2) Изготовление пластинок из альгинатного гидрогеля и оценка синерезиса;
- 3) Подготовка проб для исследования инкапсулирующих свойств альгинатного гидрогеля;
- 4) Определение содержания белка методом Бредфорда;
- 5) Определение активности бактериолитических ферментов.

3.2. Практическая часть

3.2.1. Оборудование:

- 1) УФ – Спектрофотометр.
- 2) Весы аналитические.
- 3) Настольный рН-метр.
- 4) Ультразвуковая водяная баня (30 кГц, 30 Вт).
- 5) Термостат.
- 6) Магнитная мешалка.
- 7) Шейкер для пробирок на 2 мл.
- 8) Лабораторный шейкер для планшетов.
- 9) Настольный вортекс.
- 10) Штангенциркуль (электронный).
- 11) Центрифуга настольная.
- 12) Электрофоретическая камера для вертикального ЭФ.
- 13) Заливочный столик.
- 14) Источник тока для электрофоретической камеры.

3.2.2. Расходные материалы:

- 1) Шприцевые фильтры PES 0,4 мкм и 0,22 мкм.
- 2) Шприцы объёмом 5-10 мл.
- 3) Набор механических одноканальных дозаторов.
- 4) Стекла для электрофореза.

3.2.3. Реактивы и готовые среды:

- 1) *Растворы для доведения рН* - 1 М HCl, 1М NaOH.
- 2) *HEPES-солевой буфер* - 20 мМ HEPES, рН 7.4, 140 мМ NaCl -500 мл.
Для данной работы не рекомендуется использовать фосфатно-солевой буфер (PBS), так как при контакте с ионами кальция, присутствующими в

геле, фосфаты образуют нерастворимый осадок фосфата кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), выпадающий в виде белой мути или налёта.

- 3) **Раствор овальбумина** - 2 мг/мл в HEPES-солевом буфере -5 мл.
- 4) **Раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA)**, $M_w \sim 66400$ г/моль, 1 мг/мл в HEPES-солевом буфере -5 мл.
- 5) **Раствор лизоцима** куриного яйца - $M_w \sim 14400$ г/моль, активность ~ 20000 U/мг - 2 мг/мл или 1 мг/мл в HEPES-солевом буфере -5 мл.

Лизоцим из яичного белка, концентрация 1,0 мг/мл

Концентрацию растворов овальбумина и лизоцима определяют спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см (Практикум по биохимии, 1989).

Расчёт проводят по формуле Бугера–Ламберта–Бера:

$$D = A_{0,1\%} \cdot C \cdot l \quad (5)$$

где $A_{0,1\%}$ – коэффициент удельного поглощения раствора ($\text{мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$)

C – концентрация белка (мг/мл)

l – длина оптического пути (см)

Для лизоцима $A_{0,1\%}$ принимают равным 2,64 ($\text{мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$), для овальбумина – 0,760 ($\text{мл} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$).

Чтобы попасть в рабочий диапазон значений оптической плотности спектрофотометра (до 0,8 ед. опт. плотности), исходный раствор белка разводят HEPES-солевым буфером в необходимое число раз.

- 6) **Хелатирующий буфер** - 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M ЭДТА, 6M мочевины, 1M NaCl, 5% β -меркаптоэтанол -50 мл.
Меркаптоэтанол добавляется в буфер непосредственно перед приготовлением образцов.
- 7) **Гелирующий раствор А** - 5% (w/v) CaCl_2 в дистиллированной воде -500 мл.

- 8) **Гелирующий раствор Б** - 5% (w/v) CaCl₂ в HEPES-солевом буфере -800 мл.
- 9) **Раствор альгината А** – 1,5% (w/v) в дистиллированной воде, рН~7 -10 мл.
- 10) **Раствор альгината Б** – 1,5% в HEPES-солевом буфере -15 мл.

Приготовление растворов высокомолекулярных соединений, к которым относится альгинат, требует особого внимания из-за значительной вязкости получаемых систем. Классический метод, предполагающий растворение навески в части воды с последующим доведением объёма до метки в мерной колбе, для таких растворов неприменим: высокая вязкость приводит к тому, что жидкость прилипает к стенкам мерной посуды и образует нестандартный мениск, что делает точное измерение объёма практически невозможным и вносит существенную методическую ошибку. Чтобы задать концентрацию с высокой точностью и полностью исключить погрешности, связанные с манипуляциями вязкой жидкостью, к навеске сухого полимера сразу добавляют заранее отмеренный конечный объём растворителя. Такой подход корректен, поскольку объём, занимаемый самой навеской порошка, пренебрежимо мал, а плотность 1,5% водного раствора альгината практически не отличается от плотности воды.

Если при взвешивании альгинат электризуется, проведите антистатическую обработку: слегка распылите 96% этанол над навеской и посудой. Дайте спирту полностью испариться (10–15 секунд). Это устраняет статическое электричество и обеспечивает точность взвешивания.

Растворение альгината можно проводить на магнитной мешалке с подогревом, однако этот процесс может занять несколько часов или даже продолжаться в течение ночи. Чтобы ускорить растворение и уложиться в 1–1,5 часа, рекомендуется чередовать перемешивание на магнитной мешалке (10 мин, с подогревом не выше 50°C) и обработку в

ультразвуковой водяной бане (10 мин, 30 кГц, 30 Вт). Проведите не менее трёх таких циклов до полного растворения альгината. Во избежание испарения жидкости сосуд следует закрывать (например, крышкой или парафильмом). Затем раствор последовательно фильтруют через шприцевые фильтры с мембраной из полиэфирсульфона (PES): сначала с диаметром пор 0,4 мкм, затем — 0,22 мкм. Это позволяет удалить возможные микрогелевые частицы и получить более однородную систему.

Проверьте pH водного раствора альгината. Если его значение лежит за пределами диапазона от 6 до 7.5, скорректируйте его, используя минимальные объёмы концентрированных рабочих растворов (например, 1 М HCl или NaOH), чтобы изменением общего объёма готового раствора можно было пренебречь. Щёлочь или кислоту добавляют порциями по 10–20 мкл при непрерывном интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. После внесения каждой порции выдерживают паузу 30–60 секунд для полного выравнивания pH в объёме и лишь затем проводят очередное измерение.

Готовый раствор альгината рекомендуется хранить в холодильнике при температуре +4°C не дольше двух недель.

11) **Реактив Бредфорда** – 0,01% Кумасси-G 250, 4,5% этанол, 8,5% фосфорная кислота -100 мл.

На первом этапе готовят стоковый раствор красителя. 10 мг Кумасси бриллиантового голубого G-250 растворяют в 5 мл 95% этанола. Растворение проводят при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20 минут либо растиранием в ступке (стекло–стекло). Полученный спиртовой раствор фильтруют через нейлоновый шприцевый фильтр с диаметром пор 0,4 мкм.

На втором этапе готовят рабочий раствор реактива Бредфорда. Отфильтрованный спиртовой раствор красителя вносят в 10 мл 85% фосфорной кислоты и тщательно перемешивают. Затем полученную

смесь приливают примерно к 70–80 мл дистиллированной воды, перемешивают и доводят объём водой до 100 мл (Bradford, 1976; Сафронова, 2009). Готовый реактив Брэдфорда хранят в тёмной посуде при 4°C. Срок хранения может достигать нескольких месяцев.

12) **Этиловый спирт** – 50% (для мытья кювет).

13) **Маркеры молекулярных весов.**

14) **Реактивы для электрофореза (ЭФ):**

- 40% раствор акриламида/N,N'-метиленбисакриламида (29:1), АА/БАА,
- Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис),
- Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД),
- Аммония персульфат (АПС),
- β-меркаптоэтанол,
- Глицерин,
- Додecilсульфат натрия (ДСН),
- Кислота ледяная уксусная,
- Глицин,
- Этиловый спирт,
- Соляная кислота,
- Белки-маркеры,
- Бутанол-1,
- Дистиллированная вода.

15) **Тритон X-100.**

16) **Препарат изолированных клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus***
АТСС №4698, лиофилизат.

17) **Краситель Метиленовый синий.**

18) **Гидроксид калия.**

3.2.4. Задачи

Для выполнения практических задач студентам необходимо знать правила техники безопасности и обладать базовыми навыками работы в лабораториях биохимии и молекулярной биологии.

Задача 1. Подготовка установки для заливки пластинок альгинатного гидрогеля и техника внесения армирующей подложки в диализный мешок

Для получения гелевых пластинок равномерной толщины и правильной формы используют заливочную установку, фотография которой представлена на рисунке 19. Студентам предлагается сконструировать её самостоятельно, исходя из базовых принципов, описанных ниже.

Ровную, но при этом рельефную или перфорированную пластину (основание) помещают в резервуар — в примере на рисунке 19б, в это стеклянная чашка Петри. Важно, чтобы высота основания позволяла свободно расправить рабочую часть диализного мешка на его поверхности так, чтобы зажимы по краям не создавали помех. По бокам от диализного мешка размещают прокладки, задающие толщину будущего геля. В качестве таких прокладок-разделителей можно использовать предметные стёкла для микроскопии толщиной 0,1 см (как на рисунке 19в) или полоски пластиковой канвы.

Диализный мешок и прокладки-разделители накрывают верхней пластиной (перфорированной). Для обеспечения плотного контакта между пластинами установки и диализной мембраной конструкцию придавливают грузом — на рисунке 19 эту роль выполняет стеклянный стакан с водой. Рельефная структура основания и перфорация верхней пластины необходимы для того, чтобы гелирующий раствор свободно проникал через них и равномерно смачивал диализную мембрану. Важно, чтобы раствор имел доступ к мембране со всех сторон — даже в местах, прижатых грузом.

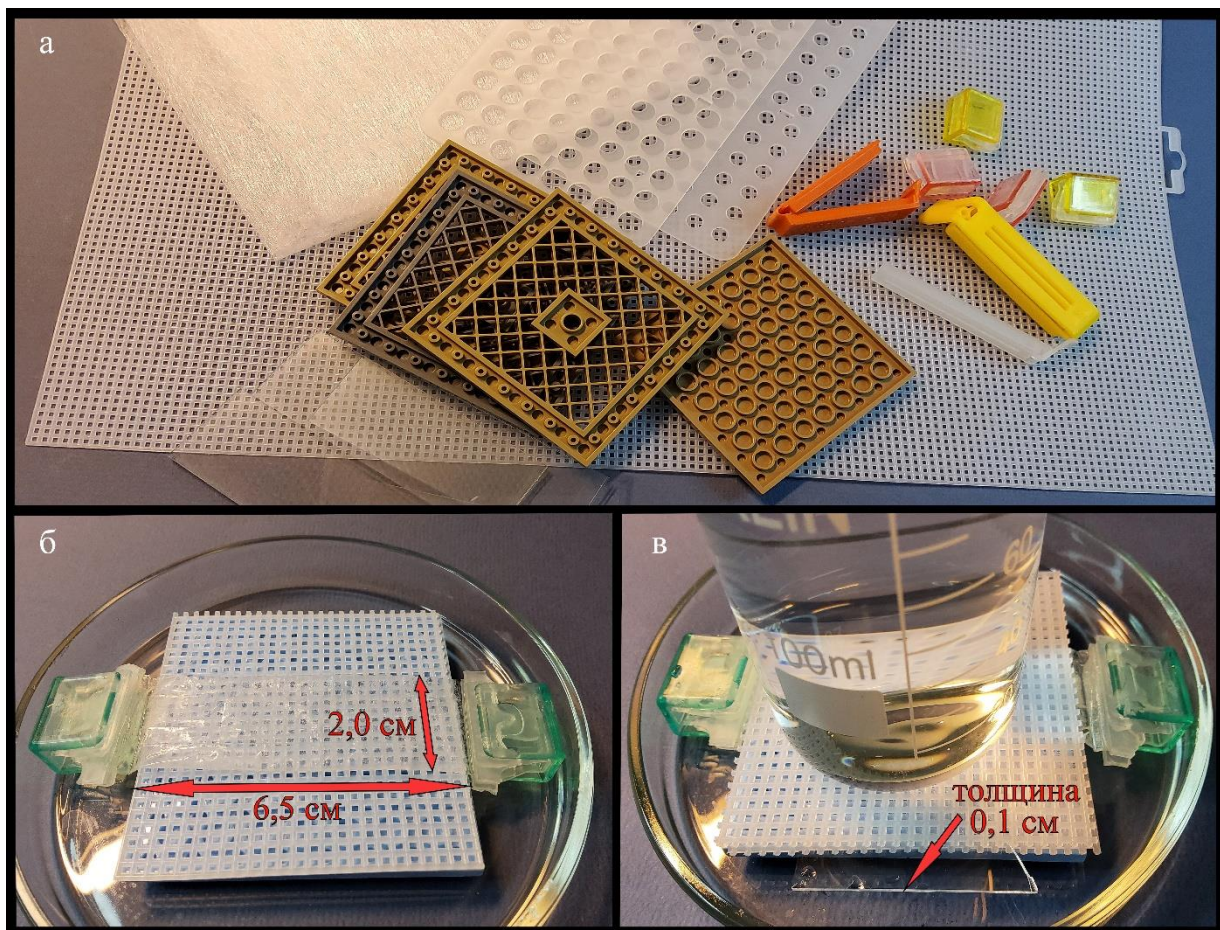


Рисунок 19. Установка для заливки пластинки альгинатного гидрогеля. а – Материалы, подходящие для конструирования установки. б – Диализный мешок, заполненный раствором альгината на заливочном основании. в – Полностью собранная установка.

Для того, чтобы улучшить доступ жидкости к поверхности диализной мембраны и обеспечить более равномерное смачивание, между диализным мешком и пластинами в установке можно поместить слой нетканого материала из гидрофобных волокон. Пример такого материала — укрывной материал, который часто используют в садоводстве (агроволокно, спанбонд). Его изготавливают из гидрофобных полипропиленовых волокон, за счёт чего такой материал не впитывает раствор, но при этом легко его пропускает.

Убедитесь, что резервуар, в котором вы собираете конструкцию, имеет достаточный объём для того, чтобы полностью покрыть её гелирующим раствором.

На рисунке 19а представлены материалы, которые можно использовать для сборки. Главное условие – они не должны содержать металлических элементов или растворимых в воде компонентов. В качестве основания и укрывной пластины подходят детали из акрилонитрилбутадиенстирола (АБС-пластика), например, элементы конструктора, а также перфорированные пластины из полиэтилена, в частности широко доступная пластиковая канва для вышивки (рис. 19а). Для фиксации краёв диализной мембраны можно использовать не только стандартные коммерческие зажимы, но и альтернативные варианты – например, зажимы для закрывания пакетов или зажимы для бумаги (рис. 19б, в).

После сборки всех деталей заливочной установки необходимо подготовить диализный мешок и, при необходимости, поместить внутрь него армирующую подложку (скаффолд). При выборе диализной мембраны обращают внимание на значение MWCO (molecular weight cut-off) — оно должно быть ниже молекулярной массы белков, используемых в работе, чтобы предотвратить их выход из пластины геля в буфер. Для лизоцима (14,3 кДа) MWCO мембраны не должен превышать 10–12 кДа.

Отрежьте нужную длину диализного мешка, оставляя по 2–3 см с каждой стороны на подгиб и закрепление краёв. В примере, представленном на рисунках 19 и 21, длина мешка составляла 12,5 см. Она складывалась из рабочей длины, которая соответствовала длине пластины-основания заливочной установки (6,5 см) и длины, оставленной на подгибку и закрепление концов (6 см). Перед работой тщательно промойте диализный мешок дистиллированной водой изнутри и снаружи. Если мешок был сухим, предварительно замочите его в тёплой (около 60°C) воде на 10–30 минут.

В качестве скаффолда можно использовать гидрофильный нетканый материал. Например, портновский флизелин — он изготовлен на основе целлюлозных волокон и поэтому хорошо смачивается водой, или плотную фильтровальную бумагу. Вырежьте армирующую подложку такого размера, чтобы её ширина была примерно на 1 мм меньше ширины мешка. В примере использована флизелиновая подложка размером 6,5 × 1,8 см. Обратите

внимание: ширину мешка измеряют после его увлажнения, так как сухой мешок может иметь другие размеры.

Измерьте и занесите характеристики заливочной установки в таблицу 2, а массу сухого скаффолда в таблицу 3.

Перед помещением в мешок армирующую подложку необходимо намочить в дистиллированной воде. Если материал плохо намокает и внутри остаются пузырьки воздуха, можно предварительно поместить его на 3–5 минут в 96% этанол, а затем перенести в воду – такой приём (проведение через спирт) улучшает смачивание.

Таблица 2. Параметры заливочной установки и расчётный объём формируемой пластины

Параметр	Значение
Длина пластины-основания заливочной установки, см	
Толщина прокладок-разделителей, см	
Ширина влажного диализного мешка, см	
Толщина двух сомкнутых стенок влажного диализного мешка, см	
Рабочая длина диализного мешка, см	
Расчётный объём формируемой гелевой пластины, см ³	

На рисунке 20 представлена техника внесения скаффолда в диализный мешок.

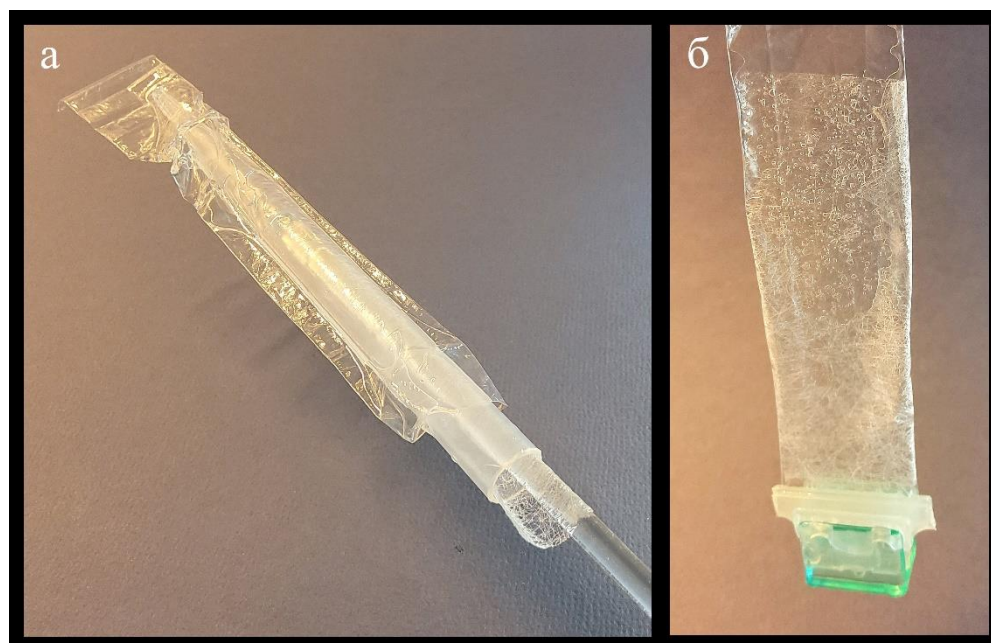


Рисунок 20. а – Техника внесения армирующей подложки внутрь диализного мешка. б – Диализный мешок со скаффолдом.

Эту операцию следует проводить аккуратно, чтобы не повредить стенки мешка. Если скаффолд представляет собой тонкий и мягкий материал (например, флизелин), для его введения удобно использовать комбинацию стеклянной палочки и пластиковой трубки с гладкими краями (рис. 20а). В качестве последней можно использовать, например, носик от автоматической пипетки на 5 мл или любую другую трубку, края которой достаточно гладкие, чтобы не повредить мембрану мешка.

Поместите диализный мешок в высокий стакан с дистиллированной водой – он всё время должен оставаться в воде или быть хорошо смоченным, чтобы не терять эластичность и не прилипать. Разъедините стенки мешка в воде и аккуратно введите внутрь пластиковую трубку. Скаффолд аккуратно оберните вокруг стеклянной палочки по длинной стороне, чтобы получился рулончик. Затем вставьте стеклянную палочку с накрученным скаффолдом в пластиковую трубку так, чтобы край материала выступал за пределы трубки примерно на 0,5 см, как показано на рисунке 20а. Пропустите конструкцию (трубку с палочкой) через мешок до того положения, где должен находиться верхний край скаффолда. Убедитесь, что с обеих сторон остаётся достаточно свободной длины мешка для

последующего подворота и закрепления концов. Прижмите выступающий край скаффолда пальцем через стенку мешка, фиксируя его на месте, и продолжайте, удерживая армирующую подложку, вытягивать пластиковую трубку. Когда трубка будет полностью извлечена, палочка со скаффолдом окажется внутри мешка, сохраняя заданное положение. С помощью стеклянной палочки аккуратно расправьте скаффолд внутри мешка, чтобы он лежал ровно, без складок. Затем сомкните края мешка, удалите лишнюю воду, подверните и закрепите нижний край защёлкой, как показано на рисунке 20б.

Геометрия заливочной установки и ширина диализного мешка определяют объём раствора альгината, который необходимо будет внести в диализный мешок. В представленной на рисунке 19 конструкции длина пластины в основании равна рабочей длине диализного мешка и составляет 6,5 см, ширина диализного мешка (в сложенном виде, после замачивания) – 2,0 см, а толщина прокладок-разделителей – 0,1 см.

При заполнении мешка жидкостью и последующем сжатии до толщины 0,1 см геометрия мешка меняется. Поскольку периметр мешка остаётся постоянным, геометрические размеры полости, формирующей будущую гелевую пластину, будут меньше исходной ширины сплюсненного мешка. Её ширину можно рассчитать по формуле 6.

$$\text{Ширина полости формирующей пластину} = \text{Ширина влажного диализного мешка} - \text{Толщина прокладок} \quad (6)$$

В приведённом примере: 2,0 см – 0,1 см = 1,9 см.

Рассчитайте теоретический объём формируемой гелевой пластины по формуле 7 и запишите полученное значение в таблицу 2. Именно такой объём раствора альгината необходимо будет внести в диализный мешок.

$$\text{Объём формируемой гелевой пластины} = \text{Рабочая длина диализного мешка} \times \text{Ширина полости формирующей пластину} \times \text{Толщина прокладок} \quad (7)$$

Как было отмечено выше, раствор альгината обладает высокой вязкостью, что вносит существенную методическую погрешность при попытке дозировать его по объёму с помощью пипетки. При этом плотность 1,5-1,125 % раствора альгината, даже приготовленного на HEPES-солевом буфере и содержащего 0,5 мг/мл белка, практически не отличается от плотности воды. Поэтому в данной работе рекомендуется вносить раствор в диализный мешок по массе – это позволяет значительно снизить погрешность дозирования и повысить точность последующей оценки синерезиса.

На рисунке 21 представлена фотография весов, на столике которых установлены баночка с раствором альгината и пластиковый носик от пипетки объёмом 1 мл. Перед началом внесения обнулите весы вместе с баночкой и носиком. Затем перенесите носиком рассчитанную массу раствора в диализный мешок, контролируя количество внесённого раствора по показаниям весов. Поскольку плотность раствора принимается равной 1,0 г/мл, масса в граммах соответствует объёму в миллилитрах. После внесения верните носик на весы – изменение массы покажет, сколько раствора фактически было перенесено (с учётом остатка в носике).

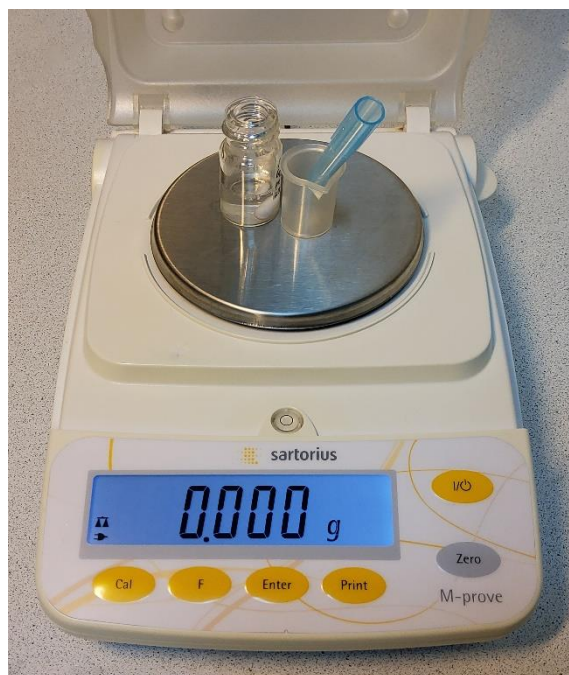


Рисунок 21. Подготовка к внесению раствора альгината в диализный мешок: баночка с раствором и носик на весах.

При внесении раствора диализный мешок должен быть погружён в дистиллированную воду или HEPES-солевой буфер – в соответствии с составом раствора альгината. После заполнения мешка аккуратно проглаживающими движениями удаляют пузырьки воздуха, не допуская вытекания раствора через верхний край. Затем, сместив жидкость в нижнюю часть мешка, закрепляют его верхний край так, чтобы строго соблюсти рабочую длину мешка.

Собирают заливочную установку, наполняют резервуар гелирующим раствором и выдерживают 15 минут для завершения гелеобразования. По истечении этого времени необходимо отмыть остатки хлорида кальция, чтобы остановить процесс синерезиса. Для этого диализный мешок со сформированной гелевой пластинкой переносят в стакан, содержащий воду или буфер (состав промывающей среды должен соответствовать составу исходного раствора альгината), и инкубируют при перемешивании дважды по 15 минут, используя 30–50-кратный объём промывочной жидкости относительно объёма геля.

Задача 2. Изготовление пластинок из альгинатного гидрогеля и оценка синерезиса

Задача данного раздела практической работы включает два этапа: приготовление серии альгинатных гидрогелевых пластинок в различных условиях и количественную оценку синерезиса в образцах без белка.

В таблице 3 приведён состав пяти групп образцов, различающихся по составу среды (дистиллированная вода или HEPES-солевой буфер), наличию подложки (формирование геля на пористом скаффолде либо без него), а также наличию инкапсулированного белка (без белка, а также с лизоцимом или овальбумином). Во всех случаях конечная концентрация альгината в геле составляет 1,125%. Это значение достигается разведением исходных 1,5% растворов альгината А (на воде) и Б (на HEPES-солевом буфере) на $\frac{1}{4}$ объёма. В образцах, содержащих белок, разведение происходит за счёт добавления раствора лизоцима или овальбумина с концентрацией 2 мг/мл до конечной концентрации белка 0,5 мг/мл. В образцах без белка недостающий объём

восполняют соответствующим растворителем — дистиллированной водой или NEPES-солевым буфером.

Таблица 3. Состав исходных растворов для приготовления гелевых пластинок

№ группы образцов геля (Г)	Описание образца	Кол-во пластинок геля в группе	Р-р альгината (1,5%), мл	Белок (2 мг/мл), мл	Вода или буфер, мл	Общий объём смеси, мл
1	Р-р альгината в воде, без белка, без подложки	2	3,0 (раствор А)	—	1,0 (вода)	4,0
2	Р-р альгината в воде, без белка, с подложкой	2	3,0 (раствор А)	—	1,0 (вода)	4,0
3	Р-р альгината в буфере, без белка, без подложки	3	4,5 (раствор Б)	—	1,5 (буфер)	6,0
4	Р-р альгината в буфере, с овальбумином , без подложки	2	3,0 (раствор Б)	1,0	—	4,0
5	Р-р альгината в буфере, с лизоцимом , без подложки	2	3,0 (раствор Б)	1,0	—	4,0

Примечание. Указанные объёмы рассчитаны для параметров заливочной установки, представленной в примере. При изменении геометрии установки объёмы следует пересчитать пропорционально.

Чтобы не запутаться в ходе эксперимента необходима чёткая система обозначений образцов. Для каждой альгинатной пластинки вводится код - **идентификатор геля**), который имеет вид Г.П, где:

Г — номер группы образцов геля в соответствии с таблицей 2.

П — номер пластинки геля в группе (1, 2 или 3).

Пример: идентификатор 4.2 означает вторую пластинку из группы 4 (альгинат с овальбумином).

Для оценки синерезиса используют образцы без белка: гелевые пластинки 1 и 2 групп, а также две пластинки из группы 3. Значения массы раствора альгината, внесённого в диализный мешок для каждого из этих образцов, заносят в таблицу 4.

Оставшаяся пластинка из группы 3, а также образцы, содержащие белок (группы 4 и 5), предназначены для исследования способности альгинатного гидрогеля инкапсулировать модельные белки. Эта часть работы выполняется в следующем разделе.

Визуальное сравнение гелевых пластинок позволяет сделать качественный вывод о выраженности синерезиса в различных условиях (рис. 22). При синерезисе гель сжимается, вследствие чего его края смещаются к центру гелевой пластинки и перестают доходить до краёв диализного мешка. Это хорошо видно на рисунке 22а (отмечено красными стрелками). В отсутствие подложки наблюдается выраженная усадка геля, тогда как наличие подложки (рис. 22 в, г) практически полностью подавляет синерезис (сравните ширину пластинок геля на рис. 22 б и г).

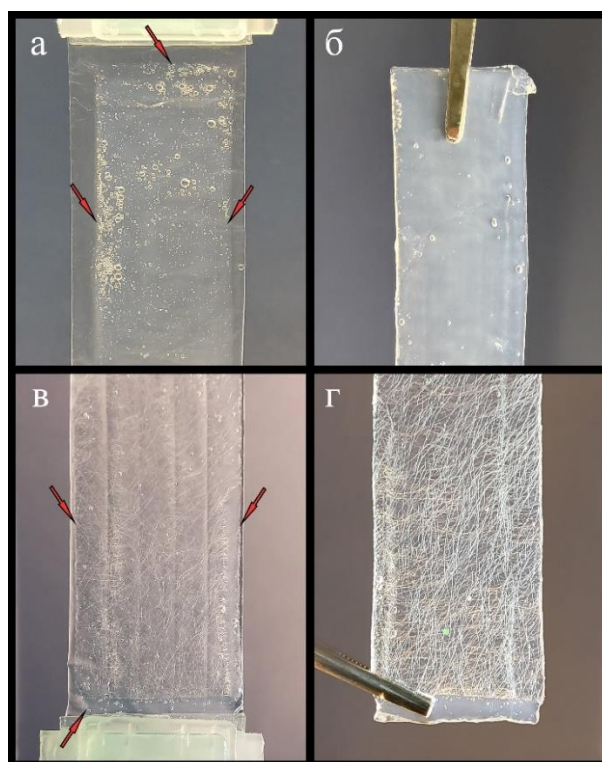


Рисунок 22. Визуальное сравнение синерезиса в альгинатных гелях, сформированных без подложки (а, б) и с армирующей подложкой из флизелина

(в, г). На изображениях а и в, полученных непосредственно после гелеобразования (гель в диализном мешке), стрелками отмечены края гелевых пластинок. Изображения б и г соответствуют аналогичным образцам после извлечения из мешка.

Для количественной оценки синерезиса необходимо определить объём полученных гелевых пластинок и сравнить его с исходным объёмом раствора альгината, внесённого в диализный мешок, выражая результат в процентах.

Объём гелевой пластинки можно определить двумя способами: расчётным – исходя из линейных размеров геля, и гравиметрическим – по массе, учитывая, что плотность геля практически соответствует плотности воды (1 г/см^3). Полученные значения заносят в таблицу 4.

При измерении линейных размеров определяют длину, ширину и толщину полученных пластинок. Следует учитывать, что гель достаточно пластичен: при извлечении из диализного мешка он может растягиваться, сжиматься или деформироваться иным образом. По этой причине измерения удобно проводить, не вынимая гель из мешка — достаточно снять защёлки, фиксирующие края. В этом случае при определении толщины с помощью штангенциркуля необходимо принимать во внимание толщину стенок влажного диализного мешка (значение, занесённое в таблицу 2).

Таблица 4. Данные для расчёта синерезиса альгинатных гелевых пластинок.

Параметр	Идентификатор геля					
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
Масса сухого скаффолда, г	—	—			—	—
Масса раствора альгината, г						
Толщина гелевой пластинки, см						
Длина гелевой пластинки, см						
Ширина гелевой пластинки, см						
Рассчитанный объём гелевой пластинки, см^3						
Масса геля, г						

Синерезис, % от исходного объёма раствора альгината						
Синерезис, % от исходной массы раствора альгината						

В образцах, содержащих подложку, поры скаффолда заполняются гелем, а волокна полностью в него погружены, благодаря чему образец представляет собой единый композитный материал. Толщина такого композита измеряется целиком, без разделения на гелевую и скаффолд-составляющие, и именно эта величина используется для оценки синерезиса.

Для гравиметрического определения объёма геля аккуратно извлекают пинцетом, удаляют капли с поверхности, промокая фильтровальной бумагой, и сразу взвешивают, не допуская высыхания. В образцах с подложкой из полученной массы следует вычесть массу сухого скаффолда (занесённую в таблицу 4), поскольку его плотность отличается от плотности геля.

Проанализируйте, как степень выраженности синерезиса зависит от условий желирования (состава среды и наличия подложки). Сравните результаты, полученные расчётным и гравиметрическим способами, и сделайте вывод о том, какой из методов предпочтительнее для данного типа образцов. На основе проведённого анализа сформулируйте выводы о влиянии исследованных факторов на синерезис альгинатных гелей.

Задача 3. Подготовка проб для исследования инкапсулирующих свойств альгинатного гидрогеля

В данном разделе практической работы исследуют способность альгинатных гелевых пластинок удерживать модельные белки – лизоцим и овальбумин. Для этого используют гелевые пластинки, содержащие белок (группы 4 и 5, таблица 3), а также оставшуюся пластинку из группы 3 без белка (контроль).

Чтобы сопоставить поведение белков с разными электростатическими свойствами, проанализируем распределение белка между гелем и буфером в двух принципиально разных режимах: в условиях равновесного распределения

(длительная инкубация) и при фракционной экстракции (быстрая многократная смена буфера). Сравнение этих режимов позволяет разделить вклад двух механизмов — диссоциации полиэлектролитных комплексов белка с матрицей геля и свободной диффузии белка из пор.

В условиях равновесного распределения прогноз определяется характером взаимодействия белка с матрицей. Для овальбумина, не взаимодействующего с гелем, по достижении равновесия концентрации белка в геле и в буфере выравниваются. Для лизоцима, прочно удерживаемого электростатическими взаимодействиями, равновесие смещено в сторону гелевой фазы: даже после длительной инкубации в буфер переходит лишь незначительная часть белка.

Фракционная экстракция позволяет оценить кинетику высвобождения и прочность удержания белка: для овальбумина ожидается быстрое снижение концентрации от фракции к фракции, кратное разведению; для лизоцима, напротив, характерно медленное и равномерное высвобождение, обусловленное прочным электростатическим связыванием с альгинатной матрицей.

Полнота картины требует также отслеживать баланс белка: сколько его было в геле исходно, сколько перешло в буфер на каждом этапе и сколько осталось в геле после всех процедур. Это технически непростая, но необходимая задача, без которой анализ останется неполным.

От каждой пластинки отрезают по три фрагмента массой примерно 0,2 г. При этом каждому из них присваивают дополнительный номер. Таким образом, полный *идентификатор фрагмента геля* приобретает вид *Г.П.Ф*, где *Ф* — номер фрагмента (1, 2 или 3).

Например, идентификатор 4.2.3 означает: группа 4, пластинка 2, третий фрагмент.

Точную массу каждого кусочка геля записывают в таблицу 6.

На следующем этапе работы каждый фрагмент геля помещают в отдельный эппендорф и добавляют буферный раствор в объёме, рассчитанном из соотношения 5:1 к массе фрагмента. Рассчитанные объёмы буфера заносят в таблицу 6. Состав буфера, цель обработки и её продолжительность для каждого

из трёх фрагментов различаются. Каждой пробе присваивают код — обозначения проб с описанием приведены в таблице 5.

В полученных пробах в дальнейшем определяют концентрацию белка методом Бредфода.

Таблица 5. Обозначение проб и схема обработки фрагментов геля для исследования инкапсулирующих свойств.

Фрагмент геля	Код пробы (К)	Цель обработки	Буфер	Условия инкубации	Описание пробы
1	Х	Определение исходного содержания белка в геле	Хелатирующий	24 ч, +7°C	Раствор фрагмента геля в хелатирующем буфере
2	Р	Оценка равновесного распределения белка	HEPES-солевой	24 ч, +7°C	Буфер после длительной экстракции белка из фрагмента геля
3	Э1	Фракционная экстракция	HEPES-солевой	3 смены буфера по 15 мин, Комнатная t°	Буфер после 1-й экстракции белка из фрагмента геля
	HEPES-солевой		Буфер после 2-й экстракции белка из фрагмента геля		
	HEPES-солевой		Буфер после 3-й экстракции белка из фрагмента геля		
3 (после экстракции)	О	Определение остаточного белка	Хелатирующий	24 ч, +7°C	Раствор фрагмента геля в хелатирующем буфере после трёхкратной экстракции белка

Примечание.

1 Полный код пробы (для маркировки пробирки) записывают как Г.П.Ф–К, где К — код пробы из таблицы 4. Например, код 4.2.3-О означает: группа 4, пластинка 2, фрагмент 3, проба для определения остаточного белка (после трёх экстракций фрагмент растворён в хелатирующем буфере).

2 Фрагмент 3 после трёх последовательных экстракций (коды Э1–Э3) переносят в хелатирующий буфер для получения пробы с кодом О.

3 В ходе инкубации пробы перемешивают на шейкере.

Таблица 6. Характеристики проб и результаты анализа.

Идентификатор фрагмента геля	Масса фрагмента геля, г	Объём буфера, мл	Код пробы	Содержание модельного белка, мг/г геля	Доля от исходного содержания белка, %
3.3.1			X	0	---
3.3.3			P	0	---
3.3.2			Э1	0	---
4.1.1			X		100
4.1.2			P		
4.1.3			Э1		
			Э2		
			Э3		
			O		
4.2.1			X		100
4.2.2			P		
4.2.3			Э1		
			Э2		
			Э3		
			O		
5.1.1			X		100
5.1.2			P		
5.1.3			Э1		
			Э2		
			Э3		
			O		
5.2.1			X		100
5.2.2			P		
5.2.3			Э1		
			Э2		
			Э3		
			O		

Задача 4. Определение содержания белка методом Бредфорда

При определении концентрации белка методом Бредфорда необходимо учитывать ряд факторов, влияющих на точность анализа. Краситель Кумасси G-250 в кислой среде несёт отрицательный заряд и связывается преимущественно с положительно заряженными остатками аминокислот на поверхности белка, а также участвует в гидрофобных взаимодействиях. Образующийся комплекс имеет максимум поглощения в области 590–595 нм. Интенсивность окрашивания зависит от аминокислотного состава белка. Так, при взаимодействии Кумасси с лизоцимом, содержащим большое количество основных аминокислот, окраска развивается сильнее, чем с овальбумином. Кроме того, на развитие окраски могут

влиять компоненты буферного раствора, в котором находится белок (в частности, хелатирующего буфера). Поэтому для корректного определения концентрации необходимо использовать стандартные растворы белка, приготовленные на том же буфере, что и анализируемые пробы, и содержащие тот же белок.

Для построения калибровочных графиков из исходных растворов овальбумина и лизоцима с концентрацией 2 мг/мл готовят стандартные растворы с концентрацией 0,1 мг/мл. Разведение проводят в HEPES-солевом и в хелатирующем буферах. Таким образом, получают четыре стандартных раствора: овальбумин в HEPES-солевом буфере, овальбумин в хелатирующем буфере, лизоцим в HEPES-солевом буфере, лизоцим в хелатирующем буфере.

Для метода Брэдфорда характерна относительно нестабильная окраска, степень развития которой зависит от времени инкубации проб. Поэтому пробы стандартного ряда и экспериментальные пробы необходимо анализировать единым набором, сводя к минимуму разрыв во времени между их заполнением. Все пробы следует тщательно перемешивать, чтобы условия развития окраски были одинаковыми.

Общий объём белкового раствора в каждой пробе должен составлять 100 мкл. С учётом чувствительности метода (1–10 мкг белка на пробу) рассчитайте необходимые объёмы белка-стандарта и соответствующего буфера, доводящего объём до 100 мкл. Полученные значения занесите в таблицу 6.

Для экспериментальных проб с предполагаемым высоким содержанием белка (например, пробы с кодом X для обоих белков, Э1 для овальбумина, О для лизоцима) рекомендуется брать на анализ 50 мкл, для остальных проб — 100 мкл. При определении концентрации белка следите, чтобы значения оптической плотности экспериментальных проб попадали в линейный участок калибровочного графика. Если оптическая плотность слишком высока, уменьшите объём вносимой пробы, компенсируя недостающий объём соответствующим буфером.

Пробы готовят в пробирках типа эппендорф. Сначала вносят рассчитанный объём буфера, затем добавляют белок и перемешивают. После этого добавляют раствор Кумасси и снова перемешивают.

Пробы, приготовленные из геля группы 3 (не содержащего модельных белков), анализируют вместе с каждой серией образцов, содержащих белок. Важно учитывать, что коммерческий альгинат может быть недостаточно очищен от белковых примесей. На это указывает, в частности, наличие поглощения раствора альгината при 280 нм, тогда как чистый альгинат в этой области прозрачен. Поэтому метод Брэдфорда может давать некоторое окрашивание и для контрольных проб по сравнению с «нулевой» пробой калибровочного ряда. Для корректного определения содержания белка в экспериментальных образцах необходимо вычесть значения, полученные для соответствующих контрольных проб (того же состава буфера).

Постройте калибровочные графики зависимости оптической плотности от содержания белка в пробе (для каждого из четырёх стандартных рядов). По полученным графикам определите содержание белка в экспериментальных пробах. Результаты занесите в таблицу 7.

Таблица 7. Схема заполнения проб и величины их оптического поглощения при определении концентрации белка методом Бредфорда.

	№	Стандартный раствор белка (0,1 мг/мл)		Буфер (ХЕПЕС-солевой, или хилатирующий), мкл	Раствор Кумасси, мл	D _{λ=595 нм, l=1}	
		мкг	мкл				
Стандартный ряд	0	-	-	100	1		
	1			100	1		
	2			100	1		
	3			100	1		
	4			100	1		
	5			100	1		
	Код пробы (Г.П.Ф-К)	Объем пробы, мкл					мкг белка (по графику)
Экспериментальные пробы					1		
					1		
					1		
					1		
					1		
					1		
					1		
					1		

Примечание. Пробы инкубируют 5 мин при комнатной температуре.

Учитывая разведения при растворении геля и приготовлении последовательных экстракций, рассчитайте содержание белка в миллиграммах на 1 г исходного геля. Для удобства сравнения пересчитайте полученные значения в проценты от исходного содержания, приняв его за 100%. Полученные

результаты занесите в таблицу 6. Сопоставьте исходное содержание белка с суммой белка, вышедшего за три экстракции, и остаточным содержанием. Сравните данные, полученные для двух модельных белков, и сделайте вывод о том, как их заряд влияет на инкапсулирующие свойства альгинатного гидрогеля и профиль высвобождения. На основе проведенного анализа сформулируйте выводы.

Задача 5. Определение активности бактериолитических ферментов

Предварительная подготовка

Подготовка материалов

При необходимости, 40% раствор акриламида/бисакриламида (АА/БАА) фильтруют с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм и дегазируют в течение 10 мин. Раствор хранят во флаконе из темного стекла при температуре 4–6°C.

Приготовление 10% раствора натрия додецилсульфата (ДСН)

В мерный стакан вместимостью 250 мл помещают 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде, очищенной при аккуратном перемешивании, избегая вспенивания, доводят объем раствора до 100 мл и вновь перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре.

Приготовление раствора аммония персульфата (АПС)

Растворяют 100,0 мг аммония персульфата в 1,0 мл воды очищенной. Раствор используют свежеприготовленным. Допускается хранение при -20°C без многократных циклов разморозки/заморозки.

Приготовление 1,5 М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 8,8)

В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 90,8 г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 8,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор фильтруют с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм и хранят при температуре 4–6 °C не более 1 мес.

Приготовление 1,0 М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8)

В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 60,6 г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 6,8 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают. Раствор фильтруют с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм и хранят при температуре 4–6 °С не более 1 мес.

Приготовление электродного буферного раствора (10×) (pH 8,3)

В мерный стакан, вместимостью 1000 мл помещают 30,0 г трис(гидроксиметил)аминометана, 144,0 г глицина и 10,0 г натрия додецилсульфата, растворяют в воде и доводят объем раствора тем же растворителем до метки. Фильтруют и измеряют pH раствора, который должен быть 8,3 - 8,4. Доводить pH раствора кислотой или щелочью до необходимого значения не допускается. Раствор хранят при комнатной температуре не более 3 мес.

Непосредственно перед анализом 1 часть приготовленного раствора смешивают с 9 частями дистиллированной воды.

Приготовление буферного раствора для образцов (5×) для электрофореза в восстанавливающих условиях с 2-меркаптоэтанолом

В химическом стакане смешивают 4,7 мл воды очищенной, 0,5 мл 1 М буферного раствора трис-гидрохлорида (pH 6,8), 0,8 мл глицерина, 1,6 мл 10% раствора натрия додецилсульфата, 0,4 мл 2-меркаптоэтанол и 2 мг бромфенолового синего. Раствор хранят при температуре 4–6 °С не более 2 недель.

Приготовление буферного раствора для ренатурации белков и проведения каталитической реакции

В мерный стакан вместимостью 500 мл помещают 1,21 г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяют в 400 мл воды. Доводят pH раствора до 7,5 с помощью 1 М раствора хлористоводородной кислоты, затем доводят объем раствора тем же растворителем до 500 мл и перемешивают.

Раствор фильтруют с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм, используют свежеприготовленным.

Приготовление буферного раствора с Тритоном X-100 для удаления ДСН из геля

К половине объема раствора для ренатурации белков, описанному в п. 1.8, добавляют 0,05% (v/v) Тритона X-100.

Приготовление фиксирующего раствора

На 100 мл: 40 мл этанола + 10 мл ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора дистиллированной водой до 100 мл и перемешивают. Хранят при комнатной температуре.

Приготовление раствора метиленового синего красителя

Для получения 0,1% раствора метиленового синего красителя, в мерный стакан на 200 мл помещают навеску метиленового синего красителя (0,1 г) и растворяют его в 100 мл 0,01% (w/v) КОН.

Приготовление 16% разделяющего геля

Перед заливкой геля основание и боковые стороны ячейки закрывают подходящими прокладками, толщина которых определяет толщину рабочего геля. Заливку растворов проводят таким образом, чтобы исключить попадание внутрь ячейки пузырьков воздуха. Сначала готовят и заливают в подготовленную ячейку нижний разделяющий гель, а затем сверху наслаивают концентрирующий гель.

В стеклянной посуде готовят рассчитанное в зависимости от объема ячейки количество раствора для разделяющего геля, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в Таблице 8. Смешивают компоненты в указанном порядке, не добавляя катализаторы полимеризации (АПС и ТЕМЕД).

Таблица 8. Приготовление разделяющего геля

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на заданное количество гелей			
	1 гель	2 геля	3 геля	4 геля
16% разделяющий гель				
Вода очищенная	1,173	1,938	2,907	3,876
Раствор АА/БАА ¹⁾	2,3	3,8	5,7	7,6
1,5 М Трис (рН 8,8) ²⁾	1,3	2,5	3,8	5,0
ДСН ³⁾	0,058	0,095	0,143	0,19
АПС ⁴⁾	0,058	0,095	0,143	0,19
ТЕМЕД ⁵⁾	0,006	0,010	0,014	0,019

¹⁾ Раствор акриламида: 40% раствор акриламида/бисакриламида (29:1)

²⁾ 1,5 М Трис (рН 8,8): 1,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида, рН 8,8

³⁾ ДСН: раствор натрия додецилсульфата 100 г/л

⁴⁾ АПС: раствор аммония персульфата 100 г/л. Аммония персульфат является источником свободных радикалов, которые управляют полимеризацией акриламида и бисакриламида. Таким образом, раствор аммония персульфата должен добавляться медленно

⁵⁾ ТЕМЕД: тетраметилэтилендиамин

Непосредственно перед полимеризацией в 1 мл приготовленного геля растворяют ПГ *M. lysodeikticus* из расчёта 0,5 мг/мл готовой смеси разделяющего геля. Для равномерного распределения аккуратно пипетируют суспензию, не допуская образования пены, в течение 5 минут. При наличии УЗ бани, можно инкубировать в ней суспензию в течение 5-7 минут. После этого суспензию вносят в основной объем приготовленной смеси разделяющего геля.

NB: Пептидогликан плохо растворим в водных растворах, поэтому допускается присутствие взвеси, однако она должна быть равномерно распределена по объему.

Добавляют соответствующие количества раствора аммония персульфата и TEMED как указано в табл. 1, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки. Оставляют достаточное место для концентрирующего геля (длина зубцов гребенки плюс 1 см).

Используя суженную пипетку, тщательно наслаивают на гель сверху по каплям 50-100 мкл бутанола-1 или этанола для выравнивания поверхности. Оставляют гель в вертикальном положении при комнатной температуре до завершения полимеризации (около 20-30 минут).

Приготовление концентрирующего геля

После окончания полимеризации жидкость с поверхности разделяющего геля удаляют и промывают верхнюю часть геля несколько раз водой, чтобы удалить остатки неполимеризованного акриламида. Сливают с верхней части геля так много жидкости, как только возможно и затем удаляют любую оставшуюся влагу фильтровальной бумагой.

Готовят соответствующее количество раствора, содержащего требуемую концентрацию акриламида, используя значения, приведенные в таблице 9. Смешивают компоненты в том же порядке, что и для разделяющего геля. После добавления соответствующих количеств раствора аммония персульфата и TEMED, как указано в таблице 9, перемешивают и немедленно заливают в промежуток между двумя стеклянными пластинами ячейки непосредственно на поверхность полимеризованного разделяющего геля. Немедленно, но с осторожностью, вставляют чистую тетрафторполиэтиленовую гребенку в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать попадания в гель воздушных пузырей. Добавляют избыточное количество раствора концентрирующего геля так, чтобы полностью заполнить пространство между зубцами гребенки.

Таблица 9. Приготовление концентрирующего геля.

Компоненты раствора	Объем компонента (мл) на заданное количество гелей			
	1 гель	2 геля	3 геля	4 геля
4% концентрирующий гель				
Вода очищенная	1,498	2,996	4,494	5,992
Раствор АА/БАА ¹⁾	0,2	0,4	0,6	0,800
1,0М Трис (рН 6,8) ²⁾	0,26	0,52	0,78	1,040
ДСН ³⁾	0,02	0,04	0,06	0,080
АПС ⁴⁾	0,02	0,04	0,06	0,080
ТЕМЕД ⁵⁾	0,002	0,004	0,006	0,008

¹⁾ Раствор акриламида: 30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1)

²⁾ 1,0 М Трис (рН 6,8): 1 М буферный раствор трис-гидрохлорида, рН 6,8

³⁾ ДСН: раствор натрия додецилсульфата 100 г/л

⁴⁾ АПС: раствор аммония персульфата 100 г/л. Аммония персульфат является источником свободных радикалов, которые управляют полимеризацией акриламида и бисакриламида. Таким образом, раствор аммония персульфата должен добавляться медленно

⁵⁾ ТЕМЕД: тетраметилэтилендиамин

Установка геля в прибор для электрофореза

Гель со вставленной гребенкой оставляют в вертикальном положении при комнатной температуре до окончания полимеризации. Полученный гель должен окончательно полимеризоваться в течение 1,5 часов. Допускается в это время термостатирование при 4°C, однако в этом случае время полимеризации должно быть увеличено (вплоть до 16-18 часов).

После окончания полимеризации аккуратно удаляют гребенку, немедленно ополаскивают лунку водой, чтобы удалить любые остатки неполимеризованного акриламида. Если необходимо, выправляют зубцы концентрирующего геля. Устанавливают гель в прибор для электрофореза

согласно инструкциям изготовителя оборудования. Добавляют электродный буферный раствор (x1) в верхнюю и нижнюю буферные емкости. Удаляют любые пузыри, которые могут появиться у основания геля между стеклянными пластинами. Не следует включать электрический ток до внесения образцов, так как это уничтожит неоднородность буферных систем.

NB: В верхнюю камеру необходимо всегда добавлять свежеразбавленный электродный буферный раствор, в нижнюю камеру допускается добавление ранее использованного раствора (не более 5 раз).

Проведение электрофореза

Смешивают исследуемые образцы белка (1,0 мг/мл, 20 мкл) с буфером для нанесения (5×) и инкубируют 3 мин при 95°C. Бычий сывороточный альбумин (БСА), не обладающий литической активностью, используют в качестве белка отрицательного контроля.

В лунки концентрирующего геля вносят по 5 мкл исследуемых образцов (итоговое количество белка – 4 мкг на лунку) и белков-маркеров. Заносят в лабораторный журнал схему нанесения образцов в лунки (рис. 23).

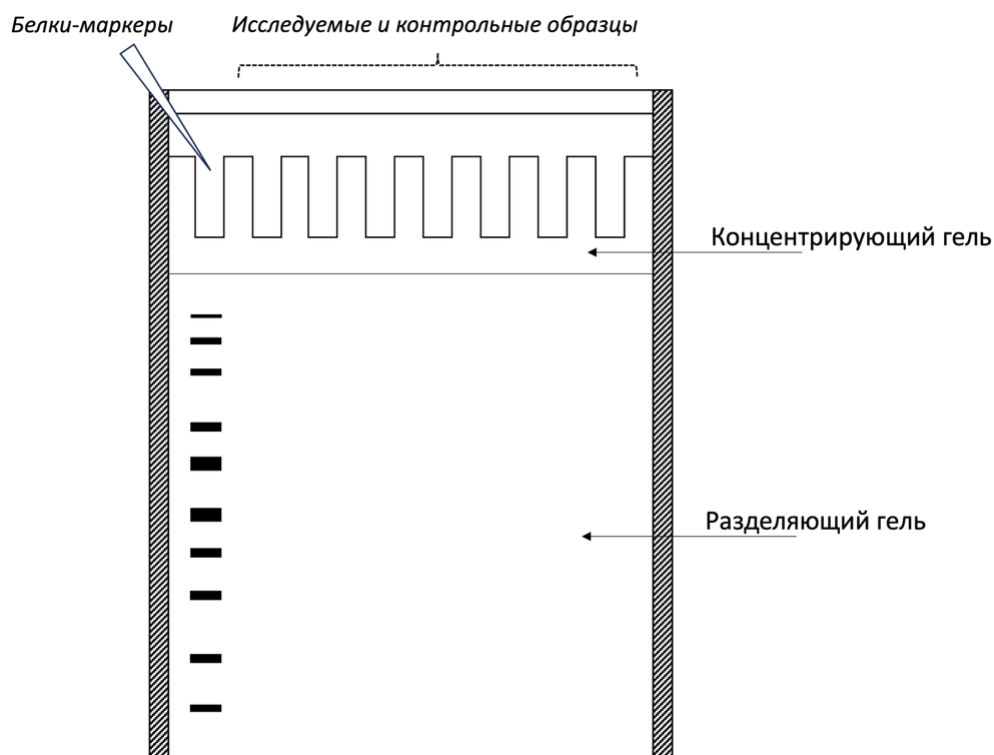


Рисунок 23. Схема нанесения образцов в гель для зимографического анализа.

Пластину соединяют с буферным раствором в электродных камерах прибора, подключают источник питания.

Электрофорез проводят при постоянном напряжении 150 В в течение 1-1,5 часов. Когда краситель-индикатор достигает основания геля, электрофорез останавливают.

Удаляют ячейку с гелем из прибора и отделяют стеклянные пластины. Удаляют прокладки, отрезают и удаляют концентрирующий гель, переносят в емкость для дальнейших процедур.

Ренатурация белков и окрашивание геля

Гель последовательно отмывают водой 15 мин, затем буферным раствором 20 мМ Трис HCl pH 7,5 с добавлением 0,05% Тритона X-100 в течение 20 мин, затем снова водой 15 мин.

Проводят ренатурацию белков, инкубируя гель в буферном растворе 20 мМ Трис HCl pH 7,5 при 37°C и 250 об/мин в течение 60 мин.

Зимограмму фиксируют смесью 10% уксусной кислоты и 40% этанола при 250 об/мин в течение 20 минут, после чего быстро промывают дистиллированной водой 2-3 раза.

Гель окрашивают 0,1% раствором метиленового синего в течение 30-40 мин при 250 об/мин и отмывают дистиллированной водой до светло-синей окраски.

NB: Допускается отмывка подогретым дистиллятом (не кипятком!!!), в этом случае отмывка происходит быстрее.

Оценка молекулярной массы белков

Молекулярные массы белков определяют по сравнению их подвижностей с подвижностью нескольких белков-маркеров известной молекулярной массы. Для автоматической оценки молекулярных масс и чистоты образцов возможно использование программного обеспечения гель-документирующей системы.

Электрофоретическая подвижность лизоцима в геле относительно белковых маркеров должна соответствовать расчётным, вычисленным на основании первичной аминокислотной последовательности: от 14,0 до 14,6 кДа для лизоцима, от 66,4 до 69,0 кДа для БСА.

Учет полученных данных

По наличию в геле выраженных негативно окрашенных областей, соответствующих расчётной молекулярной массе белков (рис. 24), делают вывод о наличии каталитической активности лизоцима (наличие) и БСА (отсутствие) в отношении ПГ клеточных стенок бактерии *M. lysodeikticus*.

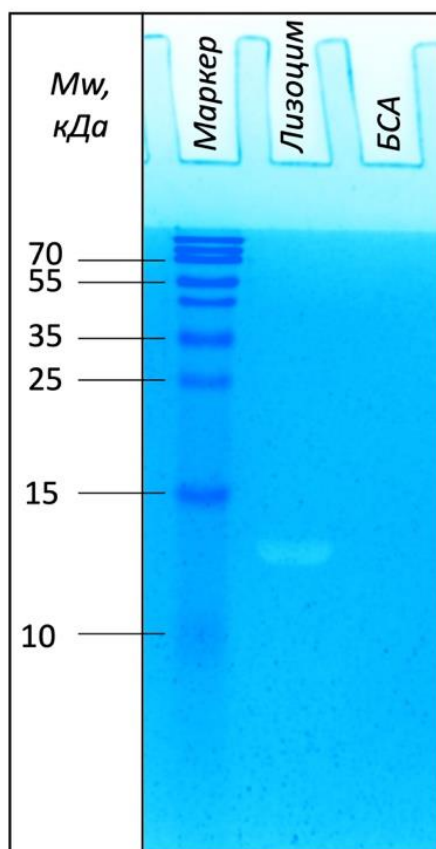


Рисунок 24. Характерная зимограмма лизоцима с использованием препарата изолированных клеточных стенок *M. lysodeikticus*. Примечание - БСА, отрицательный контроль активности; Mw, кДа, маркер молекулярной массы.

3.2.5. Оформление задач

Задача оформляется в соответствии с планом, изложенным ниже. Для ведения лабораторного журнала желательно использовать тетрадь формата А4. Не следует использовать тетради со съемными блоками. Журнал должен быть подписан. Каждое задание следует начинать с новой страницы.

Оформление задач необходимо проводить по единому плану:

1. Название задачи.
2. Дата.
3. Краткое теоретическое введение.
4. Цели работы.
5. Ход работы.
6. Результаты и их обсуждение.
7. Выводы.

Все расчёты сразу же заносятся в лабораторный журнал, использование черновиков нежелательно. Необходимо последовательно, честно и подробно описывать все процедуры, выполняемые в ходе выполнения задачи. Задания должны быть выполнены таким образом, чтобы можно было полностью воспроизвести проведенный эксперимент. Каждый новый этап эксперимента желательно записывать с новой строки или абзаца. Все данные следует записывать шариковой ручкой. Карандаши и гелевые ручки использовать не следует. Все рисунки, графики и таблицы вклеиваются в журнал в хронологическом порядке рядом с описанием этапа задания, которому они соответствуют. Рядом с рисунком должно быть подробное пояснение, что, собственно, на нем изображено. Рисунки подписываются внизу, таблицы - вверху. Допускается ведение лабораторного журнала в электронном виде (с использованием планшета или ноутбука) с выполнением всех вышеизложенных правил (за исключением, разумеется, использования шариковой ручки, что не исключает использования стилуса).

Контрольные вопросы

1. Что такое ионотропные гели? В чём отличие их механизма сшивания от термообратимых гелей (агарозы, желатина)?
2. Что такое синерезис? Какие условия (состав среды, концентрация альгината, наличие подложки) усиливают или ослабляют это явление?
3. Почему при отмывке альгинатного геля от избытка Ca^{2+} не рекомендуется использовать фосфатно-солевой буфер?
4. Как заряд белка (положительный или отрицательный) влияет на его удержание в альгинатном геле при физиологическом рН?
5. Что такое полиэлектролитные комплексы? Отличается ли процесс растворения альгинатного геля, содержащего лизоцим, от растворения геля с овальбумином?
6. Какие компоненты входят в состав «хелатирующего буфера» и для чего нужен каждый из них?
7. Какую роль выполняет армирующая подложка (скаффолд) в композитном раневом покрытии?
8. В чём разница между равновесным высвобождением белка и фракционной экстракцией? Какую информацию о характере связывания белка с матрицей даёт каждый из этих методов?
9. Почему для корректного определения белка методом Брэдфорд необходимо готовить отдельные калибровочные графики для разных белков и разных буферных систем?
10. Можно ли теоретически рассчитать суммарный заряд белка при заданном рН? Какие данные для этого необходимы и почему в данной работе заряд лизоцима и овальбумина оценивался приблизительно (с округлением до целых значений)?

Литература

1. Акулина Е.А., Бонарцева Г.А., Дудун А.А., Кочевалина М.Ю., Бонарцев А.П., Воинова В.В. Современное состояние изучения механизмов биологической активности альгинатов // Успехи биологической химии. – 2025. – Т. 65. – С. 381-418.
2. Бонарцева Г.А., Акулина Е.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Бонарцев А.П. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – №. 1. – С. 61-68.
3. Дудун А.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Влияние различных концентраций сахарозы на биосинтез поли-3-оксибутирата и альгината бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12 при разных уровнях аэрации // Прикладная биохимия и микробиология – 2024. – Т. 60. – №. 5. – С. 475-486.
4. Практикум по биохимии : учебное пособие для биологических специальностей университетов / под ред. С. Е. Северина и Г. А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Издательство Московского университета, 1989. – 509 с. – ISBN 5-211-00406-X.
5. Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Смоленск: МАКМАХ, СГМУ, 2024. 1–192 с.
6. Сафронова М.И., Зайцева Н.Н., Рубцов А.М., Гривенникова В.Г., Рыжавская А.С., Гусев Н.Б. Основы практической биохимии белка. – М.: МАКС Пресс, 2009. – 88 с. – ISBN 978-5-317-02828-2.
7. Фомина Ю. С., Семкина А. С., Загоскин Ю. Д., Алексанян М. М., Чвалун С. Н., Григорьев Т. Е. Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфиров и их сополимеров // Коллоидный журнал. – 2023. – Т. 85, № 5. – С. 682–704.
8. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. российские национальные рекомендации, 2-е переработанное и дополненное издание. М., 2015.
9. Юданова Т., Решетов И. Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Химико-фармацевтический журнал // 2006. № 2 (40). С. 24–31.
10. Abdulsalam, L.; Abubakar, S.; Permatasari, I.; Lawal, A.A.; Uddin, S.; Ullah, S.; Ahmad, I. Advanced Biocompatible and Biodegradable Polymers: A Review of Functionalization, Smart Systems, and Sustainable Applications. *Polymers* (Basel). 2025, 17, doi:10.3390/polym17212901.
11. Abourehab, M.A.S.; Rajendran, R.R.; Singh, A.; Pramanik, S.; Shrivastav, P.; Ansari, M.J.; Manne, R.; Amaral, L.S.; Deepak, A. Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and

- Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, doi:10.3390/ijms23169035.
12. Ahmed M.S., Yun S., Kim H.Y., Ko S., Islam M., Nam K.W. Hydrogels and microgels: driving revolutionary innovations in targeted drug delivery, strengthening infection management, and advancing tissue repair and regeneration // *Gels.* – 2025. – Т. 11. – №. 3. – С. 179. DOI: 10.3390/gels11030179
 13. Aitken M. и др. Recent Advances in Endolysin Engineering // *Antibiotics (Basel)*. *Antibiotics (Basel)*, 2025. Т. 14, № 12.
 14. Ajmal G., Bonde G. V., Mittal P., Khan G., Pandey V. K., Bakade B. V., Mishra B. Biomimetic PCL-gelatin based nanofibers loaded with ciprofloxacin hydrochloride and quercetin: A potential antibacterial and anti-oxidant dressing material for accelerated healing of a full thickness wound // *International Journal of Pharmaceutics.* 2019. Vol. 567. Art. 118480. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118480.
 15. Ajuebor J. и др. Bacteriophage endolysins and their applications // *Sci. Prog. Sci Prog*, 2016. Т. 99, № 2. С. 183–199.
 16. Al-Arjan W. S., Asiri A. M., Khan S. B. Role of Graphene Oxide in Bacterial Cellulose-Gelatin Hydrogels for Wound Dressing Applications // *ACS Omega.* 2023. Vol. 8, No. 13. P. 11513-11526. DOI: 10.1021/acsomega.2c07334.
 17. Alberts A., Lungescu I.A., Niculescu A.G., Grumezescu A.M. Natural products for improving soft tissue healing: Mechanisms, innovations, and clinical potential // *Pharmaceutics.* – 2025. – Т. 17. – №. 6. – С. 758. DOI: 10.3390/pharmaceutics17060758
 18. Alipoor R., Ayan M., Hamblin M.R., Ranjbar R., Rashki S. Hyaluronic acid-based nanomaterials as a new approach to the treatment and prevention of bacterial infections // *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* – 2022. – Т. 10. – С. 913912. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.913912>
 19. Alotaibi B. S., Khan A. K., Ijaz M., Yasin H., Nawazish S., Sadiq S., Kaleem S., Murtaza G. Development, Characterization, and Burn Wound-Healing Potential of Neomycin-Loaded Clay-Reinforced Nanofibers // *ACS Omega.* 2023. Vol. 8, No. 42. P. 39014-39022. DOI: 10.1021/acsomega.3c03593.
 20. Anderson J. M., Shive M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres // *Advanced drug delivery reviews.* – 1997. – Т. 28. – №. 1. – С. 5-24. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>
 21. Angra, V.; Sehgal, R.; Kaur, M.; Gupta, R. Commercialization of Bionanocomposites. *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2021*, 587–610, doi:10.1016/B978-0-12-821280-6.00017-9.

22. Antonova, N.P.; Vasina, D. V.; Grigoriev, I. V.; Usachev, E. V.; Aleshkin, A. V.; Vorobev, A.M.; Laishevtsev, A.I.; Kapustin, A. V.; Savinov, V.A.; Anurova, M.N.; et al. Pharmacokinetics and Preclinical Safety Studies of Modified Endolysin-Based Gel for Topical Application. *J. Pharm. Sci.* 2024, 113, 2093–2100, doi:10.1016/J.XPHS.2024.04.028
23. Augst A. D., Kong H. J., Mooney D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience.* 2006. Vol. 6. No. 8. P. 623-633. DOI: 10.1002/mabi.200600069
24. Bercea M., Lupu A. Recent Insights into Glucose-Responsive Concanavalin A-Based Smart Hydrogels for Controlled Insulin Delivery // *Gels.* – 2024. – Vol. 10, № 4. – P. 260. – DOI: 10.3390/gels10040260.
25. Blackburn J., Ousey K., Rippon M., Rogers A., Pastar I., Lev-Tov H. Applying antimicrobial strategies in wound care practice: a review of the evidence // *International wound journal.* – 2025. – T. 22. – №. 6. – C. e70684. DOI: 10.1111/iwj.70684
26. Bloom H. ‘Cellophane’ dressings for second-degree burns // *The Lancet.* – 1945. – T. 246. – №. 6375. – C. 559. DOI: 10.1016/S0140-6736(45)91274-8
27. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248-254. – DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
28. Broendum S. S., Buckle A. M., McGowan S. MicroReview Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins // *Mol. Microbiol.* 2018. T. 110, № 6. C. 879–896.
29. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology.* 2005. Vol. 3. No. 3. P. 238-250. DOI: 10.1038/nrmicro1098
30. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010 Feb;58(1):15-25. doi: 10.1007/s00005-009-0057-2. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20049649.
31. Bukar U.A., Sayeed M.S., Razak S.F.A., Yogarayan S., Amodu O.A., Mahmood R.A.R. A method for analyzing text using VOSviewer // *MethodsX.* – 2023. – T. 11. – C. 102339. doi: 10.5195/jmla.2022.1434
32. C. Chen, B. Deslouches, R.C. Montelaro, Y.P. Di, Enhanced efficacy of the engineered antimicrobial peptide WLBU2 via direct airway delivery in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 24, Issue 5, 2018, Pages 547.e1-547.e8, ISSN 1198-743X, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.08.029>.
33. Callewaert L., Michiels C. W. Lysozymes in the animal kingdom // *J. Biosci.* 2010. T. 35, № 1. C. 127–160.

34. Cao L., Lu W., Mata A., Nishinari K., & Fang Y. (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers*, 242, 116389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116389>
35. Cheng M, Zhang L, Zhang H, Li X, Wang Y, Xia F, Wang B, Cai R, Guo Z, Zhang Y, Ji Y, Sun C, Feng X, Lei L, Yang Y, Han W, Gu J. An Ointment Consisting of the Phage Lysin LysGH15 and Apigenin for Decolonization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Skin Wounds. *Viruses*. 2018 May 6;10(5):244
36. Chopra S., Harjai K., Chhibber S. Potential of combination therapy of endolysin MR-10 and minocycline in treating MRSA induced systemic and localized burn wound infections in mice // *Int. J. Med. Microbiol. Int J Med Microbiol*, 2016. T. 306, № 8. C. 707–716.
37. Chung P. Y. K., Gan M. Y., Chin B. Y. Pentacyclic triterpenoids as antibiofilm agents against methicillin-resistant and biofilm-forming *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2022. – T. 23. – №. 6. – C. 828-834. DOI: 10.2174/1389201022666210806092643
38. Cristea Hohotă A.G., Lisă E.L., Iacob Ciobotaru S., Dragostin I., Ștefan C.S., Fulga I., Anghel Ștefan A.M., Dragan M., Morariu I.D., Dragostin O.M. Antimicrobial smart dressings for combating antibiotic resistance in wound care // *Pharmaceuticals*. – 2025. – T. 18. – №. 6. – C. 825. DOI: 10.3390/ph18060825
39. Da Silva, J., Calheiros, D., Gonçalves, T., Silva, E. A., Carvalho, E., & Leal, E. C. (2025). Alginate-based hydrogels loaded with human β -defensin-2 promote healing of MRSA-infected wounds in a diabetic model: a preclinical proof-of-concept study. *Clinical and experimental medicine*, 25(1), 250. <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01798-6>
40. Danis-Wlodarczyk K. M., Wozniak D. J., Abedon S. T. Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application // *Antibiotics (Basel)*. *Antibiotics (Basel)*, 2021. T. 10, № 12.
41. Das M., Zandraa O., Mudenur C., Saha N., Saha P., Mandal B., Katiyar V. Composite scaffolds based on bacterial cellulose for wound dressing application // *ACS Applied Bio Materials*. 2022. Vol. 5, no. 8. P. 3722–3733. DOI: 10.1021/acsabm.2c00226.
42. Dawson, R.M.; Liu, C.Q. Analogues of Peptide SMAP-29 with Comparable Antimicrobial Potency and Reduced Cytotoxicity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011, doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.01.007.
43. De Maesschalck V., Gutiérrez D., Paeshuyse J., Lavigne R., Briens Y. Advanced engineering of third-generation lysins and formulation strategies for clinical applications // *Crit. Rev. Microbiol*. 2020. T. 46, № 5. C. 548–564.

44. Dinić M. et al. Multi-drug resistant *Staphylococcus epidermidis* from chronic wounds impair healing in human wound model // *Wound repair and regeneration*. – 2024. – Т. 32. – №. 6. – С. 799-810. <https://doi.org/10.1111/wrr.13231>
45. Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells // *Science*, 2009, Vol. 324, No. 5935, P. 1673-1677.
46. Do Pham D. D., Svobodová J., Špaček P., et al. Novel lipophosphonoxin-loaded polycaprolactone electrospun nanofiber dressing reduces *Staphylococcus aureus* induced wound infection in mice // *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11. Art. 19120. DOI: 10.1038/s41598-021-96980-7.
47. Do T., Page J. E., Walker S. Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes // *J. Biol. Chem. J Biol Chem*, 2020. Т. 295, № 10. С. 3347–3361.
48. Dudun A.A., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V., Khaydapova D.D., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Competitive biosynthesis of bacterial alginate using *Azotobacter vinelandii* 12 for tissue engineering applications // *Polymers*. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 131. <https://doi.org/10.3390/polym14010131>
49. Duyvejonck L. и др. Rapid and High-Throughput Evaluation of Diverse Configurations of Engineered Lysins Using the VersaTile Technique // *Antibiotics (Basel)*. *Antibiotics (Basel)*, 2021. Т. 10, № 3.
50. Egro F., Repko A., Narayanaswamy V., Ejaz A., Kim D. et al. Soluble chitosan derivative treats wound infections and promotes wound healing in a novel MRSA-infected porcine partial-thickness burn wound model // *PLOS ONE*. 2022. Vol. 17, no. 10. Art. e0274455. DOI: 10.1371/journal.pone.0274455.
51. Fahimirad S., Abtahi H., Satei P., Ghaznavi-Rad E., Moslehi M. Wound healing performance of PCL/chitosan based electrospun nanofiber electrospayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles // *Carbohydrate Polymers*. 2021. Vol. 259. Art. 117640. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117640.
52. Fazly Bazzaz B. S., Khameneh B., Jalili-Behabadi M.-M., Malaekheh-Nikouei B., Mohajeri S. A. Preparation, characterization and antimicrobial study of a hydrogel (soft contact lens) material impregnated with silver nanoparticles // *Contact Lens and Anterior Eye*. 2014. Vol. 37, no. 3. P. 149–152. DOI: 10.1016/j.clae.2013.09.008.
53. Ferraboschi P., Ciceri S., Grisenti P. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic // *Antibiotics*. – 2021. – Т. 10. – №. 12. – С. 1534. DOI: 10.3390/antibiotics10121534

54. Ferry T. и др. Arthroscopic «Debridement and Implant Retention» With Local Administration of Exebacase (Lysin CF-301) Followed by Suppressive Tedizolid as Salvage Therapy in Elderly Patients for Relapsing Multidrug-Resistant *S. epidermidis* Prosthetic Knee Infection // *Front. Med. (Lausanne)*. *Front Med (Lausanne)*, 2021. Т. 8.
55. Fischer M., Gebhard F., Hammer T., Zurek C., Meurer G., Marquardt C., Hoefler D. Microbial alginate dressings show improved binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds compared to commercial alginate dressings of marine origin. // *Journal of biomaterials applications*. 2017. № 9 (31). С. 1267–1276.
56. Fjell C. D., Hiss J. A., Hancock R. E., Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011. Vol. 11. No. 1. P. 37-51. DOI: 10.1038/nrd3591
57. Foroushani P. H., Rahmani E., Alemzadeh I., Vossoughi M., Pourmadadi M., Rahdar A., Díez-Pascual A. M. Curcumin sustained release with a hybrid chitosan-silk fibroin nanofiber containing silver nanoparticles as a novel highly efficient antibacterial wound dressing // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, No. 19. Art. 3426. DOI: 10.3390/nano12193426.
58. Fowler V. G. Jr., Das A.F., Lipka-Diamond J., Schuch R., Pomerantz R., Jáuregui-Peredo L., Bressler A., Evans D., Moran G.J., Rupp M.E., Wise R., Corey G.R., Zervos M., Douglas P.S., Cassino C. Exebacase for patients with *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and endocarditis // *J. Clin. Invest.* 2020. Т. 130, № 7. С. 3750–3760. doi: 10.1172/JCI136577
59. Fukushima T., Sekiguchi J. Zymographic Techniques for the Analysis of Bacterial Cell Wall in *Bacillus* // *Methods Mol. Biol. Methods Mol Biol*, 2016. Т. 1440. С. 87–98.
60. Fursov M. V. и др. Antibiofilm activity of a broad-range recombinant endolysin LysECD7: In vitro and in vivo study // *Viruses*. MDPI AG, 2020. Т. 12, № 5.
61. Gámez E., Mendoza G., Arruebo M., Arruebo M. Antimicrobial Electrospun Polycaprolactone-Based Wound Dressings: An In Vitro Study About the Importance of the Direct Contact to Elicit Bactericidal Activity // *Wound Repair and Regeneration*. 2019. DOI: 10.1089/wound.2018.0893.
62. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):710-20. doi: 10.1038/nri1180. PMID: 12949495.
63. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003. Vol. 3. No. 9. P. 710-720. DOI: 10.1038/nri1180
64. Gao Y., Wang H., Niu X. A hydrogen-bonded curdlan-chitosan/polyvinyl alcohol edible dual functional hydrogel bandage against MRSA promotes wound healing // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Vol. 259. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130154.
65. Gholipour-Kanani A., Bahrami S. H., Rabbani S., Kororian A., Razavi S. M. Poly(ϵ -caprolactone)-chitosan-poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for skin excisional and burn

- wounds in a canine model // IET Nanobiotechnology. 2018. Vol. 12, no. 5. P. 619–625. DOI: 10.1049/iet-nbt.2017.0115."
66. Giusto G., Beretta G., Vercelli C., Valle E., Iussich S., Borghi R., Odetti P., Monacelli F., Tramuta C., Grego E., Nebbia P., Robino P., Odore R., Gandini M. Pectin-honey hydrogel: Characterization, antimicrobial activity and biocompatibility // Biomedical Materials and Engineering. 2018. Vol. 29, No. 3. P. 347-356. DOI: 10.3233/BME-181730.
67. Gordillo Altamirano F.L. Phage therapy in the postantibiotic era / Gordillo Altamirano F.L., Barr J.J. // Clinical Microbiology Reviews – 2019. – Vol. 32, № 2. – P. 1–25
68. Grabowski Ł. и др. Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents // Microbiol. Res. Elsevier GmbH, 2021. T. 248.
69. Grant G. T., Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J., Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. FEBS Letters. 1973. Vol. 32. No. 1. P. 195-198. DOI: 10.1016/0014-5793(73)80770-7
70. Gregory K., Geiger L., Salisbury P. Voyant tools and descriptive metadata: A case study in how automation can compliment expertise knowledge // Journal of Library Metadata. – 2022. – T. 22. – №. 1-2. – C. 1-16. <https://doi.org/10.1080/19386389.2022.2030635>
71. Guo N, Zhang Z, Qin Y, Zhang Z, Dong H, Mao X. Genetic and bioprocess engineering strategies for microbial alginate production. Carbohydr Polym. 2026 Jun 1;381:125164. doi: 10.1016/j.carbpol.2026.125164
72. Gupta, A., Singh, M., Pant, B., et al. Collagen-GO-NAC Scaffold for Diabetic Wound Repair // Regenerative Biomaterials. 2021. Vol. 8, No. 2. P. rbab003. DOI: 10.1093/rb/rbab003.
73. Gutiérrez D., Briers Y. Lysins breaking down the walls of Gram-negative bacteria, no longer a no-go // Current Opinion in Biotechnology. – 2021. – T. 68. – C. 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.014>
74. Hamed, Z.O., Awni, A.A. & Abdulmir, A.S. Novel recombinant endolysin ointment with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from wounds and burns. Arch Microbiol 205, 104 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03434-x>
75. Han S. и др. Bacteriophage and their lysins: A new era of biocontrol for inactivation of pathogenic bacteria in poultry processing and production—A review // Food Control. Elsevier, 2022. T. 137. C. 108976.
76. Hancock R. E., Sahl H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology. 2006. Vol. 24. No. 12. P. 1551-1557. DOI: 10.1038/nbt1267

77. Haug A., Larsen B., Smidsrød O. (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, 32(2), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82100-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82100-X)
78. Hay, I.D.; Rehman, Z.U.; Moradali, M.F.; Wang, Y.; Rehm, B.H.A. Microbial Alginate Production, Modification and Its Applications. *Microb. Biotechnol.* 2013, 6, 637–650, doi:10.1111/1751-7915.12076.
79. Heinze K., Kabeto M., Martin E.T., Cassone M., Hicks L., Mody L. Predictors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci co-colonization among nursing facility patients // *American journal of infection control.* – 2019. – Т. 47. – №. 4. – С. 415-420. DOI: 10.1016/j.ajic.2018.09.026
80. Hemmati J., Azizi M., Asghari B., Arabestani M.R. Multidrug-resistant pathogens in burn wound, prevention, diagnosis, and therapeutic approaches (conventional antimicrobials and nanoparticles) // *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.* – 2023. – Т. 2023. – №. 1. – С. 8854311. doi: 10.1155/2023/8854311
81. Hernández-Arriaga A.M., Campano C., Rivero-Buceta V., Prieto M.A. When microbial biotechnology meets material engineering // *Microbial Biotechnology.* – 2022. – Т. 15. – №. 1. – С. 149-163. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13975>
82. Hernández-González A.C., Téllez-Jurado L., Rodríguez-Lorenzo L.M. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review // *Carbohydrate Polymers.* 2020. (229). С. 115514.
83. Heselpoth R. D. и др. Enzybiotics: Endolysins and Bacteriocins // *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy, Volume 2.* Springer International Publishing, 2021. С. 989–1030.
84. Hetta H.F., Sirag N., Alsharif S.M., Alharbi A.A., Alkindy T.T., Alkhamali A., Albalawi A.S., Ramadan Y.N., Rashed Z.I., Alanazi F.E. Antimicrobial peptides: The game-changer in the epic battle against multidrug-resistant bacteria // *Pharmaceuticals.* – 2024. – Т. 17. – №. 11. – С. 1555. <https://doi.org/10.3390/ph17111555>
85. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1963. Vol. 52. No. 12. P. 1145-1149. DOI: 10.1002/jps.2600521210
86. Hoefler D., Schnepf J.K., Hammer T.R., Fischer M., Marquardt C. Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2015 № 4 (26). С. 162
87. Horgan M. и др. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci // *Appl. Environ. Microbiol. Appl Environ Microbiol*, 2009. Т. 75, № 3. С. 872–874.

88. Horn J.M., Kapelner R.A., Obermeyer A.C. Macro- and Microphase Separated Protein-Polyelectrolyte Complexes: Design Parameters and Current Progress // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11, No. 4. – 578. – DOI: 10.3390/polym11040578.
89. Iaconis A. и др. Anti-Biofilm Strategies: A Focused Review on Innovative Approaches // *Microorganisms*. *Microorganisms*, 2024. Т. 12, № 4.
90. ISO 20776–1:2019 «Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
91. Jayakumar J. и др. Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus* // *J. Appl. Microbiol. J Appl Microbiol*, 2021. Т. 131, № 3. С. 1072–1082.
92. Jia Q., Fu Z., Li Y., Kang Z., Wu Y., Ru Z., Peng Y., Huang Y., Luo Y., Li W., Hu Y., Sun X., Wang J., Deng Z., Wu C., Wang Y., Yang X. Hydrogel loaded with peptide-containing nanocomplexes: symphonic cooperation of photothermal antimicrobial nanoparticles and prohealing peptides for the treatment of infected wounds // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2024. Vol. 16, no. 11. P. 13422–13438. DOI: 10.1021/acsami.3c16061.
93. Jia X., Zhou J., Ning J., Li M., Yao Y., Wang X., Jian Y., Zhao K. The polycaprolactone/silk fibroin/carbonate hydroxyapatite electrospun scaffold promotes bone reconstruction by regulating the polarization of macrophages // *Regenerative Biomaterials*. 2022. Vol. 9. Art. rbac035. DOI: 10.1093/rb/rbac035.
94. Jirofti N., Ahmadi M., Ghasemzadeh B., Mofidfar M., Hesaraki S., Samadikuchaksaraei A. Improvement of the Wound-Healing Process by Curcumin-Loaded Chitosan/Collagen Blend Electrospun Nanofibers: In Vitro and In Vivo Studies // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021. Vol. 7, No. 8. P. 3886–3897. DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00131.
95. Johnson CT, Wroe JA, Agarwal R, Martin KE, Guldberg RE, Donlan RM, Westblade LF, Garcia AJ. 2018. Hydrogel delivery of lysostaphin eliminates orthopedic implant infection by *Staphylococcus aureus* and supports fracture healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115(22):E4960
96. Jones M. L. A short history of the development of wound care dressings // *British Journal of Healthcare Assistants*. – 2015. – Т. 9. – №. 10. – С. 482–485.
97. Kalaoglu-Altan O. I., Baskan H., Meireman T. et al. Silver nanoparticle-coated polyhydroxyalkanoate based electrospun fibers for wound dressing applications // *Materials*. 2021. Vol. 14, no. 17. Art. 4907. DOI: 10.3390/ma14174907.
98. Kalirajan C., Palanisamy T. Bioengineered Hybrid Collagen Scaffold Tethered with Silver-Catechin Nanocomposite Modulates Angiogenesis and TGF- β Toward Scarless Healing in

- Chronic Deep Second Degree Infected Burns // *Advanced Healthcare Materials*. 2020. Vol. 9, no. 12. Art. e2000247. DOI: 10.1002/adhm.202000247.
99. Karizmeh M. S., Poursamar S. A., Kefayat A., Farahbakhsh Z., Rafienia M. An in vitro and in vivo study of PCL/chitosan electrospun mat on polyurethane/propolis foam as a bilayer wound dressing // *Materials Science and Engineering C*. 2022. Vol. 135. Art. 112667. DOI: 10.1016/j.msec.2022.112667.
100. Kaur P., Gondil V. S., Chhibber S. A novel wound dressing consisting of PVA-SA hybrid hydrogel membrane for topical delivery of bacteriophages and antibiotics // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 572. Art. 118779. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118779.
101. Kiumarsi A., Farahpour M. R., Ghazi Tabatabaei Z., Hamishehkar H. Porous hydrogel of siloxane-modified polyvinyl alcohol/polydopamine containing berberine chloride, exhibiting robust antibacterial activity and promoting the healing of MRSA-infected wounds // *Biomaterials Advances*. 2025. Vol. 177. Art. 214418. DOI: 10.1016/j.bioadv.2025.214418.
102. Korsmeyer R. W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983. Vol. 15. No. 1. P. 25-35. DOI: 10.1016/0378-5173(83)90064-9
103. Kortright K. E. и др. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria // *Cell Host Microbe*. *Cell Host Microbe*, 2019. Т. 25, № 2. С. 219–232.
104. Kothale D., Verma U., Dewangan N., Jana P., Jain A., Jain D. Alginate as promising natural polymer for pharmaceutical, food, and biomedical applications // *Current drug delivery*. – 2020. – Т. 17. – №. 9. – С. 755-775.
105. Kudinova, A.; Grishin, A.; Grunina, T.; Poponova, M.; Bulygina, I.; Gromova, M.; Choudhary, R.; Senatov, F.; Karyagina, A. Antibacterial and Anti-Biofilm Properties of Diopside Powder Loaded with Lysostaphin. *Pathogens* 2023, 12, 177.
106. Kuo C.K., Ma P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties // *Biomaterials*. – 2001. – Vol. 22, No. 6. – P. 511-521. – DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00201-5.
107. Kushwaha S.O., Sahu S.K., Yadav V.K., Rathod M.C., Patel D., Sahoo D.K., Patel A. Bacteriophages as a potential substitute for antibiotics: a comprehensive review // *Cell biochemistry and function*. – 2024. – Т. 42. – №. 3. – С. e4022. <https://doi.org/10.1002/cbf.4022>
108. Lachat J., Lextrait G., Jouan R., Boukherissa A. et al. Hundreds of antimicrobial peptides create a selective barrier for insect gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024. Vol. 121. No. 25. P. e2401802121. DOI: 10.1073/pnas.2401802121

- 109.Lanno G.-M., Ramos C., Preem L., Putrinš M., Laidmäe I., Tenson T., Kogermann K. Antibacterial porous electrospun fibers as skin scaffolds for wound healing applications // ACS Omega. 2020. Vol. 5, no. 46. P. 30011–30022. DOI: 10.1021/acsomega.0c04402.
- 110.Lebedeva K. O., Lebedev V. V., Klochko N. P., Cherkashina A. M. et al. Thermo-responsive hydrogels based on gelatin-alginate composition with humic acids intended for controlled drug delivery. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2024. Vol. 1415. No. 1. P. 012071. DOI: 10.1088/1755-1315/1415/1/012071
- 111.Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate: properties and biomedical applications. Progress in Polymer Science. 2012. Vol. 37. No. 1. P. 106-126. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003
- 112.Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications // Progress in Polymer Science. 2012. № 1 (37). C. 106–126.
- 113.Lee K.Y., Mooney D.J. Hydrogels for Tissue Engineering // Chemical Reviews, 2001, Vol. 101, No. 7, P. 1869-1880.
- 114.Li H. et al. Qualitative study on diabetic cutaneous wound healing secondary to radiation crosslinked bilayer collagen scaffold and collagen sponge // Scientific Reports. 2023. Vol. 13. Art. 6218. DOI: 10.1038/s41598-023-33372-z.
- 115.Li J., et al. N-acetyl cysteine-loaded graphene oxide-collagen hybrid membrane for scarless wound healing // International Journal of Nanomedicine. 2019. Vol. 14. P. 10249-10263. DOI: 10.2147/IJN.S236989.
- 116.Li J., Zhang S., He C., Ling J. Electrospun fibers based anisotropic silk fibroin film with photodynamic antibacterial therapy for S. aureus infected wound healing // International Journal of Biological Macromolecules. 2024. Vol. 254, Pt 1. Art. 127685. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127685.
- 117.Li M., Zhao P., Wang J., Zhang X., Li J. Functional antimicrobial peptide-loaded 3D scaffolds for infected bone defect treatment with AI and multidimensional printing // Materials Horizons. – 2025. – T. 12. – №. 1. – C. 20-36. <https://doi.org/10.1002/mabi.202300418>
- 118.Li X., Jiang X., Gao F., Zhou L., Wang G., Li B., Gu S., Huang W., Duan H. Study and evaluation of a gelatin-silver oxide nanoparticles releasing nitric oxide production of wound healing dressing for diabetic ulcer // PLOS ONE. 2024. Vol. 19, no. 6. Art. e0298124. DOI: 10.1371/journal.pone.0298124.
- 119.Li, C.; Nyaruaba, R.; Zhao, X.; Xue, H.; Li, Y.; Yang, H.; Wei, H. Thermosensitive hydrogel wound dressing loaded with bacteriophage lysin LysP53 //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 9. – C. 1956..
- 120.Lim, BY., Azmi, F. & Ng, SF. Activated carbon-chitosan hydrogel dressing loaded with LL37 microspheres for the treatment of infected wounds: In vivo antimicrobial and antitoxin

- assessment. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 15, 3917–3935 (2025). <https://doi.org/10.1007/s13346-025-01835-7>
121. Lin Y., Tan Y., Deng R., Gong L., Feng X., Cai Z., He Y., Feng L., Cheng B., Chen Y. Antibacterial antimicrobial peptide grafted HA/SF/Alg wound dressing containing AIEgens for infected wound treating // *ACS Omega*. 2024. Vol. 9, no. 22. P. 23499–23511. DOI: 10.1021/acsomega.4c00649.
122. Liu H., Chen R., Wang P., Fu J., Tang Z., Xie J., Ning Y., Gao J., Zhong Q., Pan X., Wang D., Lei M., Li X., Zhang Y., Wang J., Cheng H. Electrospun polyvinyl alcohol-chitosan dressing stimulates infected diabetic wound healing with combined reactive oxygen species scavenging and antibacterial abilities // *Carbohydrate Polymers*. 2023. Vol. 316. Art. 121050. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121050.
123. Liu Q., Xiong X., Ahmed N., Tang P., Cui J. Crystal hydrogels: Strategies, properties, and applications // *Chinese Chemical Letters*. – 2025. – Vol. 36, Issue 9. – P. 111707. – DOI: 10.1016/j.ccllet.2025.111707.
124. Liu X., Nielsen L. H., Kłodzińska S. N., Nielsen H. M., Qu H., Christensen L. P., Rantanen J., Yang M. Ciprofloxacin-loaded sodium alginate/poly(lactic-co-glycolic acid) electrospun nanofibers for wound dressing applications // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. Vol. 529, no. 1–2. P. 1–11.
125. Loeffler J. M., Djurkovic S., Fischetti V. A. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia // *Infect. Immun.* 2003.
126. Lood R. и др. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter Baumannii* in a mouse bacteremia model // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015.
127. Low, L.Y.; Yang, C.; Perego, M.; Osterman, A.; Liddington, R. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 34391–34403.
128. Manaa A. O., et al. Development of gelatin/pectin bioactive composite films loaded with thymol and phytosynthesized magnesium oxide nanoparticles for enhanced wound healing // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025. Vol. 332, Pt 2. Art. 148661. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2025.148661.
129. Mattar I., Landa G., Frutos-Lizano M., Izquierdo N., Tapia E., Perez M., Lujan L., Irusta S., Mendoza G., Arruebo M. Multifunctional 3D-Printed Wound Dressings Containing a Combination of Synergistic Antimicrobials in the Management of MRSA Infected Topical Wounds // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2025. DOI: 10.1021/acsaami.5c08968.

130. Min K. H., Kim J. Y., Lee H. J., Park S. H. et al. Antimicrobial Peptides and Their Biomedical Applications: A Review. *Antibiotics*. 2024. Vol. 13. No. 9. P. 794. DOI: 10.3390/antibiotics13090794
131. Mirbaha H., Tahriri M., Mozafari M., Tayebi L. Preparation and modeling of three-layered PCL/PLGA/PCL fibrous scaffolds for prolonged drug release // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. Art. 12068. DOI: 10.1038/s41598-020-68117-9.
132. Mishra S.K., Akter T., Urmi U.L., Enniful G., Sara M., Shen J., Suresh D., Zheng L., Mekonen E.S., Rayamajhee B., Labricciosa F.M., Sartelli M., Willcox M. Harnessing non-antibiotic strategies to counter multidrug-resistant clinical pathogens with special reference to antimicrobial peptides and their coatings // *Antibiotics*. – 2025. – T. 14. – №. 1. – C. 57. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14010057>
133. Mobaraki M., Bizari D., Kargozar S., Milan P. B., Ahmadi M., Agheb M., Goodarzi N., Fathi M. The Effects of Curcumin Nanoparticles Incorporated into Collagen-Alginate Scaffold on Wound Healing of Skin Tissue in Trauma Patients // *Polymers*. 2021. Vol. 13, No. 24. Art. 4291. DOI: 10.3390/polym13244291.
134. Mohamed, M. F., Abdelkhalek, A., & Seleem, M. N. (2016). Evaluation of short synthetic antimicrobial peptides for treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 6, 29707. <https://doi.org/10.1038/srep29707>
135. Mondal M. I. H., Islam M. M., Ahmed F. Enhanced wound healing with biogenic zinc oxide nanoparticle-incorporated carboxymethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone nanocomposite hydrogels // *Biomaterials Science*. 2024. Vol. 13, No. 1. P. 193-209. DOI: 10.1039/D4BM01027B.
136. Munir F. et al. Production, characterization, and antimicrobial activity of polyhydroxyalkanoates synthesized by *Bacillus* species against skin pathogens // *RSC Advances*. 2025. Vol. 15. P. 35182–35200. DOI: 10.1039/D5RA04375A.
137. Murray E., Draper L.A., Ross R.P., Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting // *Viruses*. – 2021. – T. 13. – №. 4. – C. 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680>
138. Mursalin MH, Astley R, Coburn PS, Bagaruka E, Hunt JJ, Fischetti VA, Callegan MC. Therapeutic potential of *Bacillus* phage lysin PlyB in ocular infections // *Msphere*. – 2023. – T. 8. – №. 4. – C. e00044-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00044-23>
139. Musumeci G, Carnazza ML, Loreto C, Leonardi R, Loreto C. β -Defensin-4 (HBD-4) is expressed in chondrocytes derived from normal and osteoarthritic cartilage encapsulated in PEGDA scaffold. *Acta Histochem*. 2012 Dec;114(8):805-12. doi: 10.1016/j.acthis.2012.02.001. Epub 2012 May 6. PMID: 22564496.

140. Neff A. C., Bayramov B., Matalon S., Mathew-Steiner S. S., Yang C.-H., Cai C., van Hoek M. L., Dean S. N. Novel antimicrobial peptides formulated in chitosan matrices are effective against biofilms of multidrug-resistant wound pathogens // *Military Medicine*. 2020. Vol. 185, Suppl. 1. P. 637–643. DOI: 10.1093/milmed/usz222.
141. Nicholas, M. N., Jeschke, M. G., & Amini-Nik, S. (2016). Cellularized Bilayer Pullulan-Gelatin Hydrogel for Skin Regeneration. *Tissue engineering. Part A*, 22(9-10), 754–764. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0536>
142. Nilsson A.S. Phage therapy-constraints and possibilities / Nilsson A.S. // *Upsala Journal of Medical Sciences* – 2014. – Vol. 119, № 2. – P. 192–198; Loc-Carrillo C. Pros and cons of phage therapy / Loc-Carrillo C., Abedon S.T. // *Bacteriophage* – 2011. – Vol. 1, № 2. – P. 111–114
143. Nithya S, Nimal TR, Baranwal G, Suresh MK, Anju CP, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Jayakumar R, Biswas R. 2018. Preparation, characterization and efficacy of lysostaphin-chitosan gel against *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol*. 110:157–166
144. Nordmann P., Dortet L., Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! // *Trends in molecular medicine*. – 2012. – T. 18. – №. 5. – C. 263-272. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.03.003
145. Nour El-Din HT, Elhosseiny NM, El-Gendy MA, Mahmoud AA, Hussein MMM, Attia AS. 2020. A rapid lysostaphin production approach and a convenient novel lysostaphin loaded nano-emulgel as a sustainable low-cost methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* combating platform. *Biomolecules*. 10(3):415–435
146. Nourbakhsh S., Montazer M., Khandaghabadi Z. Zinc oxide nanoparticles coating on polyester fabric functionalized through alkali treatment // *Journal of Industrial Textiles*. 2018. Vol. 47, No. 8. P. 2158-2175. DOI: 10.1177/1528083716657819.
147. Oliveira, H.; Melo, L.D.R.; Santos, S.B.; Nobrega, F.L.; Ferreira, E.C.; Cerca, N.; Azeredo, J.; Kluskens, L.D. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *J. Virol*. 2013, 87, 4558–4570.
148. Ozdil, D.; Aydin, H.M. Polymers for Medical and Tissue Engineering Applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2014, 89, 1793–1810, doi:10.1002/jctb.4505.
149. Papi M., Fiscarelli E. The fascinating history of wound healing through fine arts // *The International Journal of Lower Extremity Wounds*. – 2025. – T. 24. – №. 2. – C. 452-465. <https://doi.org/10.1177/15347346221102642>
150. Pastagia M., Euler C., Chahales P., Fuentes-Duculan J., Krueger J.G., Fischetti V.A. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and-sensitive *Staphylococcus aureus* strains // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – T. 55. – №. 2. – C. 738-744.

151. Pastagia, M.; Schuch, R.; Fischetti, V.A.; Huang, D.B. Lysins: The Arrival of Pathogen-Directed Anti-Infectives. *J. Med. Microbiol.* 2013, 62, 1506–1516, doi:10.1099/jmm.0.061028-0.
152. Patel P., Singh S., Sharma A., Gupta R. et al. Antimicrobial and antibiofilm potential of α -MSH derived cationic and hydrophobic peptides against *Escherichia coli*: Mechanistic insight through peptide-lipopolysaccharide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2025. Vol. 1867. No. 1. P. 184398. DOI: 10.1016/j.bbamem.2024.184398
153. Peng G, Tsukamoto S, Ikutama R, Nguyen HLT, Umehara Y, Trujillo-Paez JV, Yue H, Takahashi M, Ogawa T, Kishi R, Tominaga M, Takamori K, Kitaura J, Kageyama S, Komatsu M, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Niyonsaba F. Human β -defensin-3 attenuates atopic dermatitis-like inflammation through autophagy activation and the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Clin Invest.* 2022 Sep 1;132(17):e156501. doi: 10.1172/JCI156501. PMID: 35834333; PMCID: PMC9435650.
154. Qiu Y., Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, Vol. 53, No. 3, P. 321-339.
155. Raz A. и др. Isolation of phage lysins that effectively kill *Pseudomonas aeruginosa* in mouse models of lung and skin infection // *Antimicrob Agents Chemother.* 2019. T. 63, № 7. С. e00024-19.
156. Ren, Y.; Wang, Q.; Xu, W.; Yang, M.; Guo, W.; He, S.; Liu, W. Alginate-Based Hydrogels Mediated Biomedical Applications: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2024, 279, doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.135019.
157. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science.* 2006. Vol. 31. No. 7. P. 603-632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
158. Rishi P, Vashist T, Sharma A, Kaur A, Kaur A, Kaur N, Kaur IP, Tewari R. Efficacy of designer K11 antimicrobial peptide (a hybrid of melittin, cecropin A1 and magainin 2) against *Acinetobacter baumannii*-infected wounds. *Pathog Dis.* 2018 Oct 1;76(7). doi: 10.1093/femspd/fty072. PMID: 30184071.
159. Rishi P, Vashist T, Sharma A, Kaur A, Kaur A, Kaur N, Kaur IP, Tewari R. Efficacy of designer K11 antimicrobial peptide (a hybrid of melittin, cecropin A1 and magainin 2) against *Acinetobacter baumannii*-infected wounds. *Pathog Dis.* 2018 Oct 1;76(7). doi: 10.1093/femspd/fty072. PMID: 30184071.
160. Rishi P, Vashist T, Sharma A, Kaur A, Kaur A, Kaur N, Kaur IP, Tewari R. Efficacy of designer K11 antimicrobial peptide (a hybrid of melittin, cecropin A1 and magainin 2) against *Acinetobacter baumannii*-infected wounds. *Pathog Dis.* 2018 Oct 1;76(7). doi: 10.1093/femspd/fty072. PMID: 30184071.

161. Roach, D.R.; Donovan, D.M. Antimicrobial Bacteriophage-Derived Proteins and Therapeutic Applications. *Bacteriophage* 2015, 5, e1062590, doi:10.1080/21597081.2015.1062590.
162. Rodríguez-Rubio L. и др. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials // *Crit. Rev. Biotechnol. Crit Rev Biotechnol*, 2016. Т. 36, № 3. С. 542–552.
163. Röhrig C. и др. Targeting Hidden Pathogens: Cell-Penetrating Enzybiotics Eradicate Intracellular Drug-Resistant *Staphylococcus aureus* // *mBio. mBio*, 2020. Т. 11, № 2.
164. Roque-Borda C. A., Silva P. B., Rodrigues M. C., Azevedo R. B. et al. Antimicrobial Peptides: A Promising Alternative to Conventional Antimicrobials for Combating Polymicrobial Biofilms. *Advanced Science*. 2025. Vol. 12. No. 1. P. e2410893. DOI: 10.1002/advs.202410893
165. Santos D. L. S. dos и др. Advances in the application and use of bacteriophages and endolysins to inhibit *Staphylococcus aureus* contamination in foods // *Food Control. Elsevier*, 2026. Т. 182. С. 111808.
166. Savitskaya A., Masso-Silva J., Haddaoui I., Enany S. Exploring the arsenal of antimicrobial peptides: Mechanisms, diversity, and applications. *Biochimie*. 2023. Vol. 214. Pt B. P. 216-227. DOI: 10.1016/j.biochi.2023.07.019
167. Schandl S., Osondu-Chuka G., Guagliano G., Perak S., Petrini P., Briatico-Vangosa F., ... Guillaume O. Acetylation of alginate enables the production of inks that mimic the chemical properties of *P. aeruginosa* biofilm // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2025. – Т. 13. – №. 8. – С. 2796-2809.
168. Schleifer K. H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol. Rev.* 1972. Т. 36, № 4. С. 407–477.
169. Schmelcher M., Donovan D. M., Loessner M. J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials // *Future Microbiol.* 2012. Т. 7, № 10. С. 1147–1171.
170. Shan Y.-H., Peng L.-H., Liu X., Chen X., Xiong J., Gao J.-Q. Silk fibroin/gelatin electrospun nanofibrous dressing functionalized with astragaloside IV induces healing and anti-scar effects on burn wound // *International Journal of Pharmaceutics*. 2015. Vol. 479, no. 2. P. 291–301. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.067.
171. Siemssen T., Oludare A., Schemmel M., Puschmann J., Bierenstiel M. Antibacterial properties of experimentally produced birch tar and its medicinal affordances in the Pleistocene // *PLoS One*. – 2026. – Т. 21. – №. 3. – С. e0343618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0343618>
172. Siepmann J., Siepmann F. Modeling of diffusion controlled drug delivery // *Journal of controlled release*. – 2012. – Т. 161. – №. 2. – С. 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>
173. Sill T. J., Von Recum H. A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials*. – 2008. – Т. 29. – №. 13. – С. 1989-2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>

174. Sisson H. M. и др. Gram-negative endolysins: overcoming the outer membrane obstacle // *Curr. Opin. Microbiol.* *Curr Opin Microbiol*, 2024. Т. 78.
175. Sun J., Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. // *Materials* (Basel, Switzerland). 2013. № 4 (6). С. 1285–1309.
176. Sun J.-Y., Zhao X., Illeperuma W.R.K., Chaudhuri O., Oh K.H., Mooney D.J., Vlassak J.J., Suo Z. Highly stretchable and tough hydrogels // *Nature*, 2012, Vol. 489, No. 7414, P. 133-136.
177. Sun S. Progress in the Identification and Design of Novel Antimicrobial Peptides Against Pathogenic Microorganisms. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2025. Vol. 17. No. 2. P. 918-936. DOI: 10.1007/s12602-024-10402-4
178. Tan Q., Chen B., Yan X., Lin Y., Xiao Z., Hou X., Dai J. Promotion of diabetic wound healing by collagen scaffold with collagen-binding vascular endothelial growth factor in a diabetic rat model // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014. Vol. 8, No. 3. P. 195-201. DOI: 10.1002/term.1513.
179. Tanabe T., Okitsu N., Tachibana A., Yamauchi K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23, No. 3. P. 817-825. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00187-9.
180. Teo A. Q. A., Abbas A. A., et al. 3D Printed Bioactive PLGA Dermal Scaffold for Burn Wound Treatment // *ACS Materials Au*. 2023. Vol. 3, no. 3. P. 265–272. DOI: 10.1021/acsmaterialsau.2c00079.
181. Thanusha A. V., Dutta S. D., Subramanian A., Bandyopadhyay A., Maji K., Mondal D., Ganguly A., Datta P., Das M., Chattopadhyay S., Mazumder B. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with Asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns // *Materials Science and Engineering: C*. 2018. Vol. 89. P. 378–386. DOI: 10.1016/j.msec.2018.03.034.
182. Theuretzbacher U., Outtersson K., Engel A., Karlén A. The global preclinical antibacterial pipeline // *Nature Reviews Microbiology*. – 2020. – Т. 18. – №. 5. – С. 275-285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>
183. Theuretzbacher U., Piddock L. J. V. Non-traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges // *Cell Host Microbe*. Cell Press, 2019. Т. 26, № 1. С. 61–72.
184. Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // *Nature reviews Drug discovery*. – 2005. – Т. 4. – №. 2. – С. 145-160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
185. Totté J.E.E., van Doorn M.B., Pasmans S.G.M.A. Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin Staphfect SA. 100: a report of 3 cases // *Case reports in dermatology*. – 2017. – Т. 9. – №. 2. – С. 19-25.

186. Tsuji H. Poly(lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 107. – P. 97-135. – DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.017.
187. Tummalapalli M., Berthet M., Verrier B., Deopura B. L., Alam M. S., Gupta B. Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing // *International Journal of Pharmaceutics*. 2016. Vol. 505, No. 1-2. P. 234-245. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.007.
188. Vakil A. U., Ramezani M., Monroe M. B. B. Antimicrobial shape memory polymer hydrogels for chronic wound dressings // *ACS Applied Bio Materials*. 2022. Vol. 5, no. 11. P. 5199–5209. DOI: 10.1021/acsabm.2c00617.
189. Valencia-Gómez L.-E., Muzquiz-Ramos E.-M., Fausto-Reyes A.-D., Rodríguez-Arellano P.-I., Rodríguez-González C.-A., Hernández-Paz J.-F., Reyes-Blas H., Olivas-Armendáriz I. O-carboxymethyl chitosan/gelatin/silver-copper hydroxyapatite composite films with enhanced antibacterial and wound healing properties // *Journal of Biomaterials Applications*. 2022. Vol. 37, No. 5. P. 773-785. DOI: 10.1177/08853282221121879.
190. Vashchenko, O. V., Berest, V. P., Sviechnikova, L. V., Kutsevol, N. V., Kasian, N. A., Sofronov, D. S., & Skorokhod, O. (2024). Modifying Membrantropic Action of Antimicrobial Peptide Gramicidin S by Star-like Polyacrylamide and Lipid Composition of Nanocontainers. *International journal of molecular sciences*, 25(16), 8691. <https://doi.org/10.3390/ijms25168691>
191. Vasina D. V. и др. Development of novel antimicrobials with engineered endolysin LysECD7-SMAP to combat Gram-negative bacterial infections // *J. Biomed. Sci. J Biomed Sci*, 2024. T. 31, № 1. (b)
192. Vasina, D. V.; Antonova, N.P.; Shidlovskaya, E. V.; Kuznetsova, N.A.; Grishin, A. V.; Akoulina, E.A.; Trusova, E.A.; Lendel, A.M.; Mazunina, E.P.; Kozlova, S.R.; et al. Alginate Gel Encapsulated with Enzybiotics Cocktail Is Effective against Multispecies Biofilms. *Gels* 2024, 10, doi:10.3390/GELS10010060. (a)
193. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats // *Pharmacy and therapeutics*. – 2015. – T. 40. – №. 4. – C. 277.
194. Verbeken G., Convents L., Delmotte N., Draye J.P., Jennes S., Vanderkelen A., Nijs G., Lewalle P., Baudoux E., Cornu O., Vanlaere I., Pierlot A., Rose T., Pirnay J.P. Current State-Of-Play of the EU Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) Field, With an Emphasis on Belgian Human Cell and Tissue Products // *Wound Repair and Regeneration*. – 2025. – T. 33. – №. 3. – C. e70039. DOI: 10.1111/wrr.70039
195. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M. A. Peptidoglycan structure and architecture // *FEMS Microbiol. Rev. FEMS Microbiol Rev*, 2008. T. 32, № 2. C. 149–167.

196. Wahid F., Zhao X.-J., Zhao X.-Q., et al. Fabrication of bacterial cellulose-based dressings for promoting infected wound healing // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021. Vol. 13, no. 28. P. 32716–32728. DOI: 10.1021/acsami.1c06986.
197. Wang B, Zhao J, Lu W, Ma Y, Wang X, An X, Fan Z. The preparation of lactoferrin/magnesium silicate lithium injectable hydrogel and application in promoting wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2022 Nov 1;220:1501-1511. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.126. Epub 2022 Sep 16. PMID: 36122774.
198. Wang C. et al. Emerging strategies for treating medical device and wound-associated biofilm infections // *Microbial Biotechnology*. – 2024. – Т. 17. – №. 10. – С. e70035. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70035>
199. Wang D., Zhao X., Wang H. Recent advances of bacteriophage-derived strategies for biofilm control in the food industry // *Food Biosci*. Elsevier, 2023. Т. 54. С. 102819.
200. Williams L. et al. Wound care made incredibly easy! – Lippincott Williams & Wilkins, 2023
201. Winter G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig // *Nature*. – 1962. – Т. 193. – №. 4812. – С. 293-294. <https://doi.org/10.1038/193293a0>
202. Wong K. Y. и др. Endolysins against Streptococci as an antibiotic alternative // *Front. Microbiol*. Front Microbiol, 2022. Т. 13.
203. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis – Geneva: WHO, 2021
204. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis / WHO [Электронный ресурс] 2023 URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240094000> (дата обращения: 24.02.2026).
205. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. – Geneva: WHO, 2017. – 7p
206. Wu T., Huang J., Jiang Y., Hu Y., Ye X., Liu D., Chen J.. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity // *Food chemistry*. – 2018. – Т. 240. – С. 361-369. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.052.
207. Xiaojun Deng, HaiBo Wang, Chao Fang, Min Xu, Zhufei Chu, Miaomiao Li, Zheng Hou, Hongyan Qin, Hyaluronic acid based nanoparticles that mediate sustained thanatin release protect against NDM-1-resistant bacterial infections in a murine model, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 63, 2025, 102796, ISSN 1549-9634, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2024.102796>.

208. Xu L, Shen Q, Huang L, Xu X and He H (2020) Charge-Mediated Co-assembly of Amphiphilic Peptide and Antibiotics Into Supramolecular Hydrogel With Antibacterial Activity. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:629452. doi: 10.3389/fbioe.2020.629452
209. Yadav N., Yadav R., Goyal A. K., Mishra N. Advancements in peptide-based antimicrobials: A possible option for emerging drug-resistant infections. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2024. Vol. 333. P. 103282. DOI: 10.1016/j.cis.2024.103282
210. Yeaman M. R., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews.* 2003. Vol. 55. No. 1. P. 27-55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2
211. Yue Y., Liu H., Wang Y. Multifunctional SISTP dressing integrating AI-screened hexapeptide for sustained antimicrobial release and redox homeostasis in infected wounds // *Biomedical Materials.* – 2025. – Т. 20. – №. 6. – С. 065015. DOI: 10.1088/1748-605X/ae0ef4
212. Zamani S., Salehi M., Ehterami A., Rahmati M. et al. Evaluation effect of alginate hydrogel containing losartan on wound healing and gene expression. *Journal of Biomaterials Applications.* 2025. Vol. 39. No. 7. P. 762-788. DOI: 10.1177/08853282241292144
213. Zardawi, F.F.M.; Al Atrakji, M.Q.Y.M.A. The Effect of Chitosan Nanoparticle-Loaded Hydrogel and *Lavandula angustifolia* Extract on *Staphylococcus aureus*-Infected Wounds in a Rat Model: An Animal Study. *Polysaccharides* 2025, 6, 102. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides6040102>
214. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002. Vol. 415. No. 6870. P. 389-395. DOI: 10.1038/415389a
215. Zhang B., Huang Z., Guo T., Jing J., Dang Y. Accelerating infectious wound healing through bacterial cellulose/ag composite film enriched with GM-CSF // *Scientific Reports.* 2025. Vol. 15, no. 1. Art. 22142. DOI: 10.1038/s41598-025-09261-y.
216. Zhang Y. и др. Designing the Next Generation of Endolysins: A Triple Strategy Integrating Bioinformatics Mining, Engineering Modification and Encapsulation Formulation // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* Probiotics Antimicrob Proteins, 2026.
217. Zhao W.-Y., Fang Q.-Q., Wang X.-F., Hu Y.-Y., Ma L., Tan W.-Q. Chitosan-calcium alginate dressing promotes wound healing: A preliminary study // *Wound Repair and Regeneration.* 2020. Vol. 28, no. 3. P. 326–337. DOI: 10.1111/wrr.12789.
218. Zheng T., Doyle P. S. Injectable sustained-release hydrogel for high-concentration antibody delivery. *RSC Pharmaceutics.* 2025. Vol. 2. No. 1. P. 186-196. DOI: 10.1039/D4PM00290C
219. Zhou S., Wang Q., Yang W., Wang L., Wang J., You R., Luo Z., Zhang Q., Yan S. Development of a bioactive silk fibroin bilayer scaffold for wound healing and scar inhibition // *International Journal of Biological Macromolecules.* 2024. Vol. 255. Art. 128350. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128350.

220. Zyman A., Górski A., Międzybrodzki R. Phage therapy of wound-associated infections // *Folia microbiologica*. – 2022. – Т. 67. – №. 2. – С. 193-201. DOI: 10.1007/s12223-021-00946-1

Воинова Вера Владимировна
Васина Дарья Владимировна
Кочевалина Марина Юрьевна
Антонова Наталия Петровна
Бриантон Джейсон Александр
Бонарцев Антон Павлович

Биоинженерные гидрогели с антибактериальной активностью

Учебно-методическое пособие издано в авторской редакции

Сетевое издание

Ответственный за выпуск – Алимова Н.К.

Учебное издание

Системные требования:

операционная система Windows XP или новее, macOS 10.12 или новее, Linux.

Программное обеспечение для чтения файлов PDF.

Объем данных 8,2 Мб

Принято к публикации «30» апреля 2026 года

Режим доступа: <https://izd-mn.com/PDF/33MNNPU26.pdf> свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус., англ.

ООО «Издательство «Мир науки»

«Publishing company «World of science», LLC

Адрес:

Юридический адрес – 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

Почтовый адрес – 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

<https://izd-mn.com/>

**ДАННОЕ ИЗДАНИЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНО ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ
НА ЭЛЕКТРОННЫХ НОСИТЕЛЯХ**