

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ХИТОЗАН-SS-ЦИКЛОДЕКСТРИН С ЛЕВОФЛОКСАЦИНОМ НА МИКРОФЛОРУ РАН И ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ОСЕТРА

¹Г.Т. Урядова, ассистент

¹Н.А. Фокина, кандидат сельскохозяйственных наук

¹И.В. Поддубная, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

¹Л.В. Карпунина, доктор биологических наук, профессор

¹О.А. Гуркина, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

¹О.Н. Руднева, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

²Е.В. Кудряшова, доктор химических наук, профессор

²И.Д. Злотников, студент

¹*Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия*

²*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

E-mail: poddubnayaiv@yandex.ru

Ключевые слова: осетр, циклодекстрины, левофлоксацин, микрофлора кишечника, микрофлора ран, молочнокислые бактерии, общее микробное число.

Реферат. Представлены результаты определения эффективности применения комплекса хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином в заживлении механических ран ценных промысловых рыб – осетров и их кормлении. Эксперимент проводили на базе научно-исследовательской лаборатории «Прогрессивные биотехнологии в аквакультуре» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова. Исследовалась микрофлора резаных ран и толстого кишечника сеголетков осетров под действием фторхинолона, представленного левофлоксацином на основе циклодекстрина, включенного в оболочку высокомолекулярного хитозана. Исследуемые микробиологические показатели были выбраны для определения на том основании, что изменения общего количества микроорганизмов показывают характер течения воспалительного/патологического процесса, способствующего развитию микроорганизмов (в т.ч. условно-патогенных) и молочнокислых бактерий в кишечнике, поэтому являются важными физиологическими показателями формирования «кишечного иммунитета». Было обнаружено, что применение при лечении резаных ран у осетров циклодекстрина с левофлоксацином приводит к значительному уменьшению общего микробного числа (ОМЧ) на их поверхности (в 10 тыс. раз по сравнению с группой без лечения). Показано, что использование в кормлении осетров циклодекстрина с левофлоксацином также снижает общее микробное число в толстом кишечнике. Данный комплекс характеризуется хорошей растворимостью и биодоступностью для рыб. Результаты исследования в перспективе могут найти применение в аквакультуре при лечении механических травм, полученных при перевозке и сортировке в процессе выращивания, у рыб.

INFLUENCE OF THE COMPLEX OF CHITOSAN-SS-CYCLODEXTRIN WITH LEVOFLOXACIN ON THE MICROFLORA OF THE WOUNDS AND THE COLON INTESTINE OF THE STURGEON

¹G.T. Uryadova, Assistant

¹N.A. Fokina, PhD in Agricultural Sciences

¹I.V. Poddubnaya, Doctor of Agricultural Sciences, Professor

¹L.V. Karpunina, Doctor of Biological Sciences, Professor

¹O.A. Gurkina, PhD in Agricultural Sciences, Associate Professor

¹O.N. Rudneva, PhD in Agricultural Sciences, Associate Professor

²E.V. Kudryashova, Doctor of Chemical Sciences, Professor

²I.D. Zlotnikov, Student

¹Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia

²Lomonosov Moscow State University, M.V. Lomonosov, Moscow, Russia

E-mail: poddubnayaiv@yandex.ru

Keywords: sturgeon, cyclodextrins, levofloxacin, intestinal microflora, wound microflora, lactic acid bacteria, total microbial count.

Abstract. The authors in the article presented the results of determining the effectiveness of using the chitosan- β -cyclodextrin complex with levofloxacin in the healing of mechanical wounds of valuable commercial fish sturgeons and their feeding. The experiment was conducted based on the “Progressive biotechnologies in aquaculture” research laboratory of the Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering, N.I. Vavilov. The microflora of incised wounds and the large intestine of sturgeon fingerlings under the influence of fluoroquinolone, represented by levofloxacin based on cyclodextrin, included in the shell of high-molecular chitosan, was studied. The studied microbiological indicators were chosen to determine that changes in the total number of microorganisms show the nature of the course of the inflammatory/pathological process, which contributes to the development of microorganisms (including opportunistic pathogens) and lactic acid bacteria in the intestine. Therefore, they are essential physiological indicators of the formation of “intestinal immunity. It was found that the use of cyclodextrin with levofloxacin in the treatment of incised wounds in sturgeons leads to a significant decrease in the total microbial number (TMC) on their surface (by 10 thousand times compared to the group without treatment). It has been shown that using cyclodextrin with levofloxacin in feeding sturgeons reduces the total microbial number in the large intestine. This complex is characterised by good solubility and bioavailability for fish. The future study results can be used in aquaculture to treat mechanical injuries received during transportation and sorting in the rearing process in fish.

В последние 10–15 лет ведется разработка комплексов циклодекстринов (ЦД) [1] для создания новых лекарственных форм антимикробных препаратов. Циклодекстрины широко применяются в фармацевтике в качестве комплексобразующих агентов, которые повышают растворимость лекарственных субстанций, увеличивают их биодоступность и стабильность [2, 3]. Почти 85% лекарственных препаратов применяются перорально [4], поэтому научные изыскания по увеличению растворимости лекарственных средств являются актуальными. Ведутся работы по созданию комплексов ЦД с антибиотиками [5, 6]. Антибиотики широкого спектра действия, эффективные по отношению к множеству различных бактерий, к которым относится и левофлоксацин, могут поражать до 30% бактерий, в норме заселяющих желудочно-кишечный тракт [7]. Известно, что антибиотики применяются в комплексной терапии и для профилактики инфекционных заражений резаных, ожоговых и других видов ранений и повреждений наружных покровов [8, 9]. У рыб, как и других живых организмов, также могут возникать механические травмы наружных покровов, например, имеет место быть травматизация при перевозке, сортировке в процессе выращивания [10]. Имеются многочисленные сведения о применении пробиотиков и антибиотиков для лечения ран [10] и паразитарных язв [11] на коже рыб.

Целью настоящей работы явилось исследование состава микрофлоры резаных ран и тол-

стого кишечника сеголетков осетров под действием комплексного препарата фторхинолона левофлоксацина на основе циклодекстрина, включенного в оболочку высокомолекулярного хитозана. Комплексный препарат представлял собой порошок светло-желтого цвета, который добавляли в корм осетрам. Важными физиологическими показателями микрофлоры кишечника являются изменения общего количества микроорганизмов и молочнокислых бактерий, участвующих в формировании «кишечного иммунитета» [12].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперимент проводили на базе научно-исследовательской лаборатории «Прогрессивные биотехнологии в аквакультуре» Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова. Лечебные свойства комплекса циклодекстринов с левофлоксацином в отношении резаных ран определяли на сеголетках гибрида русского и сибирского осетров при добавлении в корм комплекса хитозан- β -циклодекстрин с левофлоксацином в концентрации 23 %. Профилактические свойства комплексов с левофлоксацином изучались при введении этого вещества в концентрации 15 %. Были сформированы 4 группы: 1-я группа – контрольная; 2-я – рыбы с раной без лечения; 3-я – профилактическая, рыбы которой получали хитозан-

β-циклодекстрин с антибиотиком с целью предотвращения развития возможных заболеваний кожи и нарушений в желудочно-кишечном тракте; 4-я группа – рыбы с ранами, для заживления которых были применены хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином. Корм с препаратом рыбы получали ежедневно (3 раза в день). Раны моделировали, делая дорсальные надрезы (длиной 2 см) кожных покровов. Общее микробное число (ОМЧ) в смывах с ран, ОМЧ и количество молочнокислых бактерий в кишечнике рыб определяли методом последовательных разведений [13] на мясо-пептонном агаре (МПА) и на MRS-агаре соответственно.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли по стандартным методам [14] с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе исследований было показано, что комплекс хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином оказывал значительное влияние на микрофлору ран и толстого кишечника рыб. В 4-й опытной группе с лечением комплексом хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином, как видно из табл. 1, к концу эксперимента (10-е сутки) наблюдали уменьшение общего микробного числа в ранах в 10 тыс. раз по сравнению с группой без лечения, в то время как у рыб без лечения к 10-м суткам ОМЧ не уменьшалось, а возрастало в 10 раз по сравнению с 1-ми сутками.

В табл. 2 представлены данные по изучению влияния данного комплекса на микрофлору толстого кишечника осетров.

Таблица 1

Влияние комплекса хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином на микрофлору резаных ран осетров, КОЕ/г
Study of the effect of the complex of chitosan-β-cyclodextrin with levofloxacin on the microflora of sturgeon incised wounds

Группа	Сутки		
	1-е	5-е	10-е
2-я	$4,0 \cdot 10^5 \pm 0,4$	$1,7 \cdot 10^5 \pm 0,7$	$1,0 \cdot 10^6 \pm 0,2^{* \bullet}$
4-я	$3,0 \cdot 10^5 \pm 1,5$	$1,0 \cdot 10^4 \pm 0,6^{\bullet}$	$1,0 \cdot 10^2 \pm 0,7^{* \bullet \blacksquare}$

Примечание. $p \leq 0,05$: * относительно значения 1-х суток в своей же группе; ● относительно значения 5-х суток в своей же группе (для 10-х суток); ■ относительно значения в группе без лечения в эти же сутки.

Note. $p \leq 0,05$: * relative to the value of the 1st day in the same group; ● relative to the value of the 5th day in its group (for the 10th day); ■ relative to the value in the group without treatment on the same day.

Таблица 2

Влияние комплекса хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином на микрофлору толстого кишечника осетров, КОЕ/г
Study of the effect of the complex of chitosan-β-cyclodextrin with levofloxacin on the microflora of the large intestine of sturgeons

Группа	Сутки					
	1-е		5-е		10-е	
	ОМЧ	МКБ	ОМЧ	МКБ	ОМЧ	МКБ
1-я	$1,0 \cdot 10^6 \pm 0,4$	$1,0 \cdot 10^5 \pm 0,4$	$1,8 \cdot 10^6 \pm 0,5$	$1,5 \cdot 10^5 \pm 0,3$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 0,4$	$1,0 \cdot 10^5 \pm 0,3$
2-я	-	-	$1,0 \cdot 10^6 \pm 0,3$	$1,0 \cdot 10^2 \pm 0,1$	$2,0 \cdot 10^6 \pm 0,8$	$1,0 \cdot 10^3 \pm 0,2^{* \bullet \blacksquare}$
3-я	-	-	-	-	$1,0 \cdot 10^5 \pm 0,1^{\bullet \blacksquare}$	$5,0 \cdot 10^3 \pm 0,8^{\bullet \blacksquare}$
4-я	-	-	$1,0 \cdot 10^6 \pm 0,3$	$1,0 \cdot 10^3 \pm 0,1$	$1,6 \cdot 10^5 \pm 0,4^{* \bullet \blacksquare}$	$1,0 \cdot 10^2 \pm 0,1^{* \bullet \blacksquare}$

Примечания. 1. $p \leq 0,05$ ● относительно значения 1-х суток в контрольной группе;

* относительно значения 5-х суток в своей же группе; ■ относительно значения 10-х суток в контрольной группе. 2. «-» – исследование не проводилось. 3. МКБ – молочнокислые бактерии.

Notes. 1. $p \leq 0,05$ ● relative to the value of the 1st day in the control group;

* Relative to the value of 5 days in their group; ■ relative to the value of the 10th day in the control group. 2. «-» - the study was not conducted. 3. LAB - lactic acid bacteria.

Во 2-й группе (без лечения) на 10-е сутки ОМЧ было таким же, как в контроле. Число молочнокислых бактерий к концу эксперимента уменьшалось по сравнению с 1-ми сутками в 100 раз и начинало восстанавливаться к 10-м суткам – увеличивалось в 10 раз по сравнению с 5-ми сутками.

В 3-й группе, рыбы которой получали лечебный комплекс профилактически, к концу эксперимента наблюдали снижение ОМЧ и молочнокислых бактерий в 10 и 100 раз соответственно по сравнению с контролем (1-я группа).

Как видно из табл. 2, в 4-й группе рыб с лечением происходило снижение ОМЧ к 10-м суткам в 10 раз сравнению с группой рыб без лечения. Уменьшение молочнокислых бактерий к 10-м суткам в этой группе по сравнению с другими группами, возможно, объясняется хорошей растворимостью и биодоступностью данного комплекса.

Изменения в контроле на протяжении всего эксперимента были незначительны и недостоверны. Можно предположить, что такой выраженный антимикробный и заживляющий эффект достигался не только за счет левоф-

локсацина, но и за счет хитозана, который, как известно, обладает антимикробной, антимикотической и иммуномодулирующей активностью [15, 16].

ВЫВОДЫ

1. Использование в заживлении резаных ран у осетров комплексом хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином значительно снижает обсемененность поверхности ран по сравнению с группой без лечения.

2. Комплекс хитозан-β-циклодекстрин с левофлоксацином снижает общее микробное число и количество молочнокислых бактерий в толстом кишечнике в опытных группах осетров по сравнению с контролем. При этом у осетров, получавших профилактическую концентрацию препарата, к концу эксперимента наметилась тенденция к восстановлению числа молочнокислых бактерий в отличие от группы рыб с лечением. Полученные результаты в перспективе могут найти применение в аквакультуре при лечении механических травм рыб.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Очистка β-циклодекстрина от комплексообразователя* / Н.Г. Гулюк, Т.С. Пучкова, Д.М. Пихало, Ю.И. Комаров // Достижения науки и техники АПК. – 2014. – Т. 28, № 10. – С. 72–73.
2. *Дейген И.М., Егоров А.М., Кудряшова Е.В.* Структура и стабильность комплексов фторхинолонов с гидроксипропил-β-циклодекстрином для создания новых лекарственных форм противотуберкулезных препаратов // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2015. – Т. 56, № 6. – С. 387–392.
3. *Циклодекстрины и их применение в фармацевтической промышленности (обзор)* / С.А. Кедик, А.В. Панов, В.С. Тюкова, М.С. Золотарева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 3. – С. 68–75.
4. *Душкин А.В., Сунцова Л.П., Халиков С.С.* Механохимическая технология растворимости лекарственных веществ // Pharmaceutical sciences. – 2013. – N 1. – P. 448–457.
5. *Исследование влияния способа получения комплексов включения грамицидина С и β-циклодекстрина на их технологические показатели* / А.А. Дранников [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 102–108.
6. *Наноструктуры, включающие пероксидазу редьки черной, антибиотики и циклодекстрины для создания различных фармацевтических композиций [Электронный ресурс]* / А.Н. Серкова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2–3. – С. 518–522. – URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=36845> (дата обращения: 10.11.2022).
7. *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota* / С. Jernberg, S. Löfmark, C. Edlund, J.K. Jansson // The ISME journal. – 2007. – Vol. 1, N 1. – P. 56–66.
8. *Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П.* Антибактериальная терапия в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений при ожогах // Российский медицинский журнал. – 1997. – № 5. – С. 24–30.

9. Привольнев В.В., Каракулина Е.В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 3. – С. 214–222.
10. Шульга Е.А., Грозеску Ю.Н., Бахарева А.А. Лечебные свойства пробиотика «Субтилис» при репарации кожных покровов осетровых рыб // Вестник АГТУ. Серия: Рыбное хозяйство. – 2009. – № 1. – С. 86–89.
11. Ихтиопатологические исследования производителей судака *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) в период нерестовой кампании в прудовом хозяйстве / В.Н. Хорошельцева [и др.] // Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса: сб. тр. IX науч.-практ. конф. молодых учёных с междунар. участием, посвящ. 140-летию ВНИРО. – М., – ВНИРО, 2021. – С. 194–196.
12. Данилевская Н.В. Физиологическая роль основных представителей нормальной микрофлоры мелких домашних животных // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2008. – № 1. – С. 28–31.
13. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина. – 1978. – 394 с.
14. Воробьев В.Я., Елсуков А.И. Теория и эксперимент. – Минск: Высшая школа, 1989. – 109 с.
15. Куликов С.Н., Хайруллин Р.З., Тюрин Ю.А. Антибактериальная активность хитозана в отношении энтеробактерий и стафилококков, выделенных у пациентов с дисбактериозом кишечника // Казанский медицинский журнал. – 2010. – № 5. – С. 656–660.
16. Топурия Л.Ю., Топурия Г.М. Эффективность применения хитозана в качестве иммуностимулятора для сельскохозяйственных животных и птиц // Ветеринарное дело. – 2010. – № 1. – С. 61–68.

REFERENCES

1. Gulyuk N.G., Puchkova T.S., Pihalo D.M., Komarov YU.I., *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2014, T. 28, No. 10, pp. 72–73. (In Russ.)
2. Deigen I.M., Egorov A.M., Kudryashova E.V., *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya*, 2015, T. 56, No. 6, pp. 387–392. (In Russ.)
3. Kedik S.A., Panov A.V., Tyukova V.S., Zolotareva M.S., *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2016, No. 3, pp. 68–75. (In Russ.)
4. Dushkin A.V., Suntsova L.P., Khalikov S.S., *Pharmaceutical sciences*, 2013, No. 1, pp. 448–457. (In Russ.)
5. Drannikov A.A. i dr., *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2022, T. 11, No. 2, pp. 102–108. (In Russ.)
6. Serkova A.N. i dr., *Fundamental'nye issledovaniya*, 2015, No. 2–3, pp. 518–522, URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=36845> (data obrashcheniya: 10.11.2022). (In Russ.)
7. Jernberg C., Löfmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota, *The ISME journal*, 2007, Vol. 1, No. 1, pp. 56–66.
8. Alekseev A.A., Krutikov M.G., Yakovlev V.P., *Rossiiskii meditsinskii zhurnal*, 1997, No. 5, pp. 24–30. (In Russ.)
9. Privol'nev V.V., Karakulina E.V., *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*, 2011, T. 13, No. 3, pp. 214–222. (In Russ.)
10. Shul'ga E.A., Grozesku Yu.N., Bakhareva A.A., *Vestnik AGTU. Seriya: Rybnoe khozyaistvo*, 2009, No. 1, pp. 86–89. (In Russ.)
11. *Sovremennye problemy i perspektivy razvitiya rybokhozyaistvennogo kompleksa*, Sbornik trudov IX nauchno-prakticheskoi konferentsii, 2021, pp. 194–196. (In Russ.)
12. Danilevskaya N.V., *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal. Melkie domashnie i dikie zhivotnye*, 2008, No. 1, pp. 28–31. (In Russ.)
13. Labinskaya A.S., *Mikrobiologiya s tekhnikoi mikrobiologicheskikh issledovaniy* (Microbiology with the technique of microbiological research), Moscow: Meditsina, 1978, 394 p. (In Russ.)

14. Vorob'ev V.YA., Elsukov A.I., *Teoriya i eksperiment* (Theory and experiment), Minsk: Vysshaya shkola, 1989, 109 p. (In Russ.)
15. Kulikov S.N., Khairullin R.Z., Tyurin Yu.A., *Kazanskii meditsinskii zhurnal*, 2010, No. 5, pp. 656–660. (In Russ.)
16. Topuriya L.Yu., Topuriya G.M., *Veterinarnoe delo*, 2010, No.1, pp. 61–68. (In Russ.)