



УДК 57.594(579.61)

## ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БИОСОВМЕСТИМОГО ПОЛИМЕРНОГО СОЕДИНЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКОЗОВ

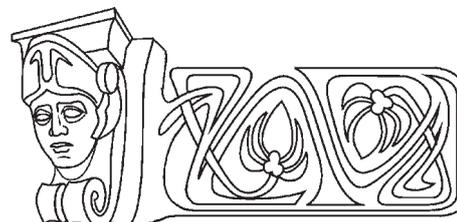
О. В. Нечаева<sup>1</sup>, О. Г. Шаповал<sup>1</sup>, М. М. Вакараева<sup>2</sup>,  
Д. А. Заярский<sup>2</sup>, Н. Ф. Шуршалова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет

<sup>3</sup>Саратовский государственный университет

E-mail ogshapoval@gmail.com.



Оценена антимикробная активность нового полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в отношении клинических штаммов *Candida albicans*, как устойчивых, так и чувствительных к флуконазолу и амфотерицину. В исследованиях использованы 4 варианта полимера с различным содержанием гидрат-ионов йода. Установлено, что все образцы полимера проявили противогрибковую активность в отношении опытных штаммов микроскопических грибов.

**Ключевые слова:** *Candida albicans*, биосовместимый полимер, антимикробная активность.

### Evaluation of Antimicrobial Activity of Biocompatible Polymeric Compounds Against Pathogens Opportunistic Mycoses

O. V. Nechaeva, O. G. Shapoval, M. M. Vakaraeva,  
D. A. Zayrskiy, N. F. Shurshalova

Antimicrobial activity of new modified by halogens hydrate ions polymer «polyazolidinammonium» has been studied against clinical resistant and sensitive to amphotericin and fluconazole strains of *Candida albicans*. Four samples of the polymer with different concentration of iodine hydrate ions were tested. It has been shown that all samples of the polymer have antifungal activity against the tested strains of microscopic fungi.

**Key words:** *Candida albicans*, biocompatible polymer, antimicrobial activity.

### Введение

В настоящее время актуальной проблемой продолжает оставаться распространение устойчивости микроорганизмов различных таксономических групп, включая грибы, к используемым на практике средствам этиотропной химиотерапии. Одним из основных путей решения данной проблемы является поиск новых соединений с антимикробной, в том числе противогрибковой, активностью. При этом следует учесть, что антибиотики, широко применяемые для лечения бактериальных инфекций, включают уже более 10 групп по химическому строению, в то время как основную группу антимикотических

препаратов с возможностью перорального и парентерального применения составляют только азолы (триазолы – флуконазол, итраконазол, вориконазол, имидазолы – кетоконазол, миконазол, клотримазол) и полиены (амфотерицин В) [2, 3]. Это существенно усложняет резервную антимикотическую терапию. Кроме того в лабораторной и клинической практике существует необходимость в антисептических средствах, обладающих широким спектром антимикробного действия, низкой токсичностью и отсутствием раздражающего эффекта [1].

В этиологической структуре оппортунистических микозов основную роль играют дрожжеподобные грибы рода *Candida*, входящие в состав нормальной микрофлоры полости рта, нижних отделов мочеполовой системы и толстого кишечника. Одним из ведущих патогенов являются представители вида *Candida albicans*. Например, при кандидозном вульвовагините *C. albicans* часто сохраняет ведущие позиции возбудителя, включая 49–90% всех изолированных культур рода *Candida* [2–4]. При этом количество устойчивых к полиенам и азолам штаммов может быть различным – от 9 до 50%.

В связи с актуальностью и востребованностью решения данной проблемы целью нашего исследования явилось определение противогрибковой активности нового полимерного соединения – полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами галогенов, в отношении клинических штаммов *C. albicans*.

### Материалы и методы

В качестве экспериментальной модели были использованы клинические штаммы *C. albicans*, выделенные от беременных женщин с кандидозным вульвовагинитом, находившихся на плановой госпитализации в роддоме № 4 г. Саратова.

Полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами галогенов (ПААГ), а также



ряд его модификаций были предоставлены ООО НПО «Альтернатива» (г. Саратов). Данный полимер и его модификации характеризуются высокой антибактериальной активностью и относятся к IV классу токсичности [5, 6]. Кроме того, ранее нами было установлено, что ПААГ проявил противогрибковую активность в отношении стандартного штамма *C.albicans* 18, и значения его минимальной подавляющей концентрации (МПК) составили 125 мкг/мл [7].

Противогрибковую активность ПААГ и его модификаций определяли методом двукратных серийных разведений в сахарном бульоне при микробной нагрузке  $5 \times 10^5$  м.т./мл [8]. В ходе проведенных исследований была определена МПК четырех образцов полимера с исходной концентрацией основного вещества  $10^5$  мкг/мл через 24 и 48 часов инкубации при температуре 37°C. Указанные образцы отличались содержанием гидрат-ионов йода. Модификация ПААГ гидрат-ионами йода проводилась в буферной среде с pH 8,5–9, при температуре 60°C в течение

45 минут при непрерывном перемешивании под действием ультрафиолетового излучения с длиной волны 265 нм. В процессе модификации было подготовлено четыре образца полимерного соединения: ПААГ-1, ПААГ-2, ПААГ-3 и ПААГ-4 с содержанием гидрат-ионов йода 0,25, 0,5, 1 и 1,5 мг/мл соответственно.

Предварительно аналогичным методом определяли чувствительность опытных штаммов к флуконазолу и амфотерицину В.

Для подтверждения достоверности полученных результатов все исследования проводили в пяти повторностях. На основе полученных значений МПК для всех образцов ПААГ рассчитывали значение МПК<sub>50</sub> для удобства сравнения эффективности их действия [9].

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы была проведена оценка чувствительности исследуемых штаммов микроскопических грибов к широко используемым противогрибковым препаратам, показатели которой представлены в таблице.

**Противогрибковая активность модификаций полимерного соединения в отношении клинических штаммов *C.albicans***

Исследуемый штамм <i>C.albicans</i>	Отношение к флуконазолу и амфотерицину В*	Значения МПК, мг/мл			
		ПААГ-1	ПААГ-2	ПААГ-3	ПААГ-4
№ 1	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	1,6	1,6	1,6	6,2
№ 2	am <sup>r</sup> flu <sup>r</sup>	1,6	6,2	1,6	6,2
№ 3	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	1,6	6,2	1,6	6,2
№ 4	am <sup>r</sup> flu <sup>r</sup>	6,2	1,6	6,2	6,2
№ 5	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	3,1	3,1	3,1	6,2
№ 6	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	6,2	1,6	3,1	6,2
№ 7	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	3,1	3,1	3,1	6,2
№ 8	am <sup>r</sup> flu <sup>r</sup>	6,2	6,2	12,4	24,8
№ 9	am <sup>s</sup> flu <sup>s</sup>	3,1	1,6	3,1	6,2
№ 10	am <sup>r</sup> flu <sup>r</sup>	3,1	3,1	3,1	6,2

Примечание. «am<sup>s</sup>flu<sup>s</sup>» – штамм, чувствительный к амфотерицину В (МПК ≤ 1 мкг/мл) и флуконазолу (МПК ≤ 32 мкг/мл), «am<sup>r</sup>flu<sup>r</sup>» – штамм, устойчивый к амфотерицину В (МПК ≥ 2 мкг/мл) и флуконазолу (МПК ≥ 64 мкг/мл).

В результате установлено, что 60% штаммов (*C.albicans* №№ 1, 3, 5, 6, 7, 9) чувствительно как к флуконазолу, так и к амфотерицину В [10]. Остальные штаммы (*C.albicans* №№ 2, 4, 8, 10) были устойчивы к обоим препаратам.

Затем была определена чувствительность клинических штаммов *C.albicans* к исходному полимерному соединению ПААГ. Было установлено, что все исследованные клинические штаммы микроскопических грибов проявили высокую устойчивость к исследуемому препарату, так как через 24 часа инкубирования при температуре 37°C во всех пробирках с разведениями полимера наблюдался рост в

виде равномерного помутнения, аналогичный контрольным образцам.

Для повышения эффективности препарата было проведено насыщение исходного полимерного соединения гидрат-ионами йода и определена их антимикробная активность. Полученные результаты представлены в таблице.

Установлено, что независимо от отношения к антимикотическим препаратам через 24 часа после посева видимый рост штаммов отсутствовал во всех опытных разведениях образцов полимера, в отличие от контрольных посевов. Через 48 часов после посева значения МПК ПААГ-1 для штаммов *C.albicans* №№ 1,



2, 3 составляли 1,6 мг/мл, для №№ 5, 7, 9, 10 – 3,1 мг/мл, №№ 4, 6, 8 – 6,2 мг/мл. Показатели МПК ПААГ-2 для штаммов №№ 2 и 3 по сравнению с показателями для ПААГ-1 были в 4 раза выше (6,2 мг/мл), а штаммы №№ 4 и 6, наоборот, проявили большую чувствительность к ПААГ-2. Для остальных штаммов *C. albicans* значения МПК данных образцов были сопоставимы и не зависели от концентрации гидрат-ионов йода в составе полимера. МПК ПААГ-3 и ПААГ-1 также практически не отличались между собой для всех штаммов. ПААГ-4 по сравнению с остальными образцами согласно значениям МПК проявил меньшую активность в отношении подавляющего большинства штаммов. Следует отметить, что среди четырех устойчивых к амфотерицину и флуконазолу штаммов только один (№8) проявил низкую чувствительность к ПААГ (МПК ПААГ-3 – 12,4, ПААГ-4 – 24,8 мг/мл). Согласно значениям  $MIC_{50}$  для каждого из образцов полимера, которые составили соответственно для ПААГ-1 – 2,2, ПААГ-2 – 2,04, ПААГ-3 – 2,2 и ПААГ-4 – 4,8 мг/мл, отмечено преобладание противогрибковой активности первых трех образцов над последним (ПААГ-4) с максимальным содержанием гидрат-ионов йода.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об антимикотической активности полиазолидинаммония с повышенным содержанием гидрат-ионов йода в отношении клинических штаммов *C. albicans*. Отсутствие взаимосвязи между отношением к флуконазолу и амфотерицину и чувствительностью к испытываемому полимеру свидетельствует о различиях в механизмах их действия. Известно, что азолы и амфотерицин действуют на цитоплазматическую мембрану грибов. Азолы ингибируют зависимый от цитохрома P-450 фермент – 14 $\alpha$ -деметилазу, имеющий важное значение в синтезе мембранного липида – эргостерола, что ведет к нарушению деления и разрушению грибковой клетки, а амфотерицин непосредственно связывается с эргостеролом цитоплазматической мембраны, нарушая, таким образом, ее барьерную функцию и способствуя образованию пор [11, 12]. Механизм антимикробного действия испытываемого полимера в настоящее время нами окончательно не изучен, однако, известно, что гидрат-ионы йода взаимодействуют с S-H-группами белковых молекул, что позволяет предположить их инактивацию данным полимерным соединением. Принимая во внимание присутствие йода в составе полимера, не исключается также повреждающее действие его на мембрану микроскопических грибов вследствие окисления основных компо-

нентов. Меньшая чувствительность исследуемых штаммов к ПААГ с максимальным содержанием гидрат-ионов йода (1,5 мг/мл) по сравнению с другими образцами препарата может быть связана с экранирующим эффектом молекулы полимера. Очевидно, при взаимодействии с клеткой гриба молекулы полимера претерпевают конформационные изменения, частично ослабляя окислительную активность части гидрат-ионов йода. Безусловно, эти предположения требуют дальнейшего изучения.

Необходимо отметить, что полученные значения МПК различных образцов ПААГ достаточно высоки по сравнению с МПК антимикотических препаратов для энтерального и парэнтерального применения. Однако эти значения не превышают концентрации рабочих растворов широко применяемых антисептиков и дезинфектантов (например, 1% раствор соответствует 10 мг действующего вещества в 1 мл). Таким образом, препараты ПААГ с содержанием гидрат-ионов йода 0,25, 0,5 и 1,0 мг/мл благодаря низкой токсичности и отсутствию раздражающего эффекта могут рассматриваться в качестве перспективных антисептических и дезинфекционных средств с антимикотической активностью [1].

#### Список литературы

1. Пхакадзе Т. Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002. Т. 4, № 1. С. 42–48.
2. Vijaya D., Dhanalakshmi T. A., Kulkarni S. Changing trends of vulvovaginal candidiasis // J. laboratory Physicians. 2014. Vol. 6, iss. 1. P. 28–30.
3. Можейко Л. Ф., Новикова Е. В. Современные принципы терапии кандидозного вульвовагинита // Мед. новости. 2011. № 2. С. 34–36.
4. Салов И. А., Дятлова Л. И. Чувствительность к антимикотическим препаратам дрожжеподобных грибов, выделенных у пациенток с хроническим рецидивирующим кандидозным вульвовагинитом // Успехи современного естествознания. 2002. № 3. С. 11–14.
5. Нечаева О. В., Заярский Д. А., Вакараева М. М., Веденева Н. В., Тихомирова Е. И. Изучение биологической активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат ионами галогенов, и его модификаций в отношении микроорганизмов // Вестн. развития науки и образования. 2014. № 1. С. 32–36.
6. Нечаева О. В., Шуриалова Н. Ф., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Сорокин В. В., Вакараева М. М., Веденева Н. В. Биологическая активность соединений ряда енаминов и их модифицированных аналогов в отношении референс-штаммов и клинических изо-



- лятов бактерий // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 12, ч. 1. С. 127–130.
7. Нечаева О. В., Ульянов В. Ю., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Вакараева М. М. Влияние биосовместимого полимерного соединения на выживаемость возбудителей инвазивных микозов // *Проблемы мед. микологии*. 2014. Т. 6, № 2. С. 106.
  8. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.1890-04. М. : Изд. отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. 91 с.
  9. Ашмарин И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. : Медгиз, 1962. 180 с.
  10. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. М. : Мир, 2001. 486 с.
  11. Зырянов С. К., Леонова М. В. Терапевтическая значимость фармакокинетики противогрибковых средств // *Клиническая фармакокинетика*. 2005. Т. 2, № 1. С. 49–63.
  12. Сергеев А. Ю., Сергеев Ю. В. Грибковые инфекции : Руководство для врачей. М. : Бином. 2004. 440 с.

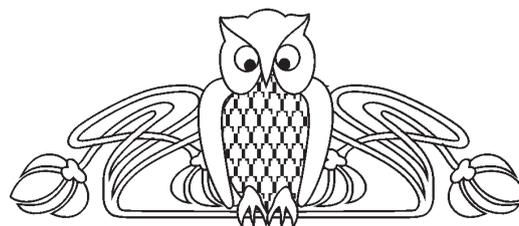
УДК 579.835+581.19

## ОСОБЕННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7 И Sp245 ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ПРИСУТСТВИИ ФЛАВОНОИДОВ

А. А. Петрунина<sup>1</sup>, М. В. Каневский<sup>1, 2</sup>,  
Ю. П. Федоненко<sup>2</sup>, О. И. Гулий<sup>2</sup>, С. А. Коннова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет  
E-mail: Konnovasa@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений  
и микроорганизмов РАН, Саратов  
E-mail: room308@ibppm.sgu.ru



Показано, что выращивание *Azospirillum brasilense* Sp245 и Sp7 в присутствии эффективных концентраций рутина и кверцетина, установленных для данных культур, приводило к изменениям электрооптических характеристик суспензий бактериальных клеток. Продемонстрировано изменение в этих условиях физико-химических и антигенных свойств поверхности бактериальных клеток и макромолекулярной организации ЛПС.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, кверцетин, рутин, липополисахарид.

### Physicochemical and Antigenic Properties of Surface Glycopolymers of *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp245, Grown in the Presence of Flavonoids

A. A. Petrunina, M. V. Kanevskiy, Yu. P. Fedonenko,  
O. I. Guliy, S. A. Konnova

It is shown that the cultivation of *Azospirillum brasilense* Sp245 and Sp7 in the presence of effective concentrations of rutin and quercetin, established for these strains, led to changes in the electro-optical characteristics of the bacterial cell suspensions. Changes of physicochemical and antigenic properties of the bacterial cell surface and macromolecular organization of lipopolysaccharides are demonstrated, when grown in these conditions.

**Key words:** *Azospirillum*, quercetin, rutin, lipopolysaccharide.

Бактерии рода *Azospirillum* относятся к группе микроорганизмов, стимулирующих рост растений. Интерес к азоспириллам вызван их

способностью формировать ассоциативные отношения с широким спектром растений, в том числе с важнейшими кормовыми культурами и хлебными злаками, а также их способностью продуцировать физиологически активные вещества – фитогормоны и витамины [1]. При формировании ассоциативных отношений важную роль играют вторичные метаболиты растений, выделяемые в ризосферу, а также макромолекулы, представленные на поверхности бактериальных клеток. В частности, показано, что в формировании микробного окружения растения участвуют флавоноиды – полифенольные соединения, содержащиеся в экссудатах корней [2] – а также гликополимеры (липополисахариды (ЛПС) и капсульные полисахариды (КПС)), локализованные на поверхности бактериальных клеток и занимающие до 75% площади поверхности внешней мембраны [3].

Данные о влиянии флавоноидов на установление ассоциативных отношений микроорганизмов с растениями немногочисленны. Ранее было показано, что под влиянием экстрактов корней пшеницы, а также отдельных представителей класса флавоноидов происходят изменения состава и структуры ЛПС и КПС бактерий рода *Azospirillum* [4–6].