

Антибактериальная активность модифицированных углеродных сорбентов, перспективных для аппликационного применения

*В. Т. ДОЛГИХ¹, Л. Г. ПЬЯНОВА², Е. В. НАУМКИНА³, А. В. ЛАВРЕНОВ²,
Е. В. МАТУШЧЕНКО³, Н. В. КОРНИЕНКО²

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНЦ РР, Москва

² Центр новых химических технологий ФГБУН «Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН», Омск

³ Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск

Antibacterial Activity of Modified Carbon Sorbents, Prospective for Application

*V. T. DOLGIKH¹, L. G. PYANOVA², E. V. NAUMKINA³, A. V. LAVRENOV², E. V. MATUSHCHENKO³, N. V. KORNIENKO²

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow

² Center of New Chemical Technologies of Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Omsk

³ Omsk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Omsk

Цель — изучить антибактериальные и антимикотические свойства углеродных сорбентов, модифицированных биологически активными веществами, в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний. **Материал и методы.** Изучалась активность растворов модификаторов и модифицированных образцов углеродных сорбентов в отношении тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов в сравнении с исходным образцом углеродного сорбента. Из тест-штаммов микроорганизмов готовили взвесь с известным содержанием микробных клеток, инкубировали в лунках с исследуемыми образцами в течение 48 ч. Выживаемость микроорганизмов определяли путём количественных высевов из каждой лунки смеси «образец — микроорганизм» через определённые промежутки времени термостатирования на чашки Петри с простым питательным агаром, затем подсчитывали количество жизнеспособных микробных клеток в исследуемой смеси. **Результаты.** Проведённые исследования продемонстрировали высокую антибактериальную и антимикотическую активность модифицированных углеродных сорбентов. Наилучший результат в сравнении с исходным образцом показал углеродный сорбент, модифицированный олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом. Проведённые исследования показали перспективность использования модифицированных образцов углеродного сорбента для аппликационной терапии бактериальных инфекций.

Ключевые слова: углеродные сорбенты, модификаторы, синтез, сорбционная терапия, микробиоценоз, тест-штаммы микроорганизмов.

The aim of the work is to study the antibacterial and antimycotic properties of carbon sorbents modified with biologically active substances in relation to pathogens of purulent-inflammatory diseases. *Material and methods.* The activity of modifier solutions and modified samples of carbon sorbents was studied in relation to test strains of opportunistic microorganisms in comparison with the initial sample of carbon sorbent. A suspension with a known content of microbial cells was prepared from test strains of microorganisms; it was incubated in wells with test samples for 48 hours. The survival of microorganisms was determined by quantitative inoculation from each well of the sample and microorganism mixture at regular intervals of incubation on Petri dishes with simple agar nutrient, then the number of viable microbial cells in the test mixture was counted. *Results.* Studies have shown high antibacterial and antimycotic activity of modified carbon sorbents. The best result in comparison with the initial sample was demonstrated by a carbon sorbent modified with lactic acid oligomers and immobilized lysozyme. Studies have shown the promise of using modified carbon sorbent samples for the application therapy in bacterial infections.

Keywords: carbon sorbents, modifiers, synthesis, sorption therapy, microbiocenosis, test strains of microorganisms.

Введение

В последнее десятилетие в медицине критических состояний исследуется эффективность использования сорбционной терапии — детоксикация организма с помощью перфузии биологической жидкости (крови, лимфы) через колонку с

сорбентом, либо энтерального или аппликационного применения углеродных сорбентов [1]. Гемосорбенты, энтеросорбенты и вальверсорбенты предназначены для удаления из организма эндогенных и экзогенных токсичных продуктов с одновременным повышением чувствительности организма к базисной фармакотерапии.

Основными методами лечения больных с гнойно-воспалительными заболеваниями различной локализации является этиотропная и патоген-

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: E-mail: prof_dolgi@mail.ru

нетическая терапия. Вместе с тем, антибактериальные препараты оказывают эффект по истечении длительного времени, негативно влияют на микробиоценоз, увеличивают число антибиотикорезистентных микроорганизмов и оказывают побочное действие на организм. В этой связи для лечения больных с раневой инфекцией и тяжёлыми гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы необходимы новые подходы и препараты, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков и обладающие высокой антимикробной и антимикотической активностью.

По нашему мнению, одним из приоритетных направлений сорбционной терапии является аппликационная сорбция — вульнеросорбция [2–4], сущность которой заключается в извлечении токсичных веществ, продуктов клеточной дегенерации, микробных клеток, бактериальных токсинов из ран при контакте сорбционного материала с раневой поверхностью. Сорбция раневого содержимого позволяет в короткие сроки уменьшить травматический или воспалительный отёк мягких тканей, улучшить микроциркуляцию в тканях, снизить количество микроорганизмов в ране в среднем в 100–1000 раз по сравнению с традиционными асептическими перевязочными материалами. Вульнеросорбция позволяет существенно улучшить исходы лечения травматических, гнойных и ожоговых ран, трофических язв и др. Широко используется внутриполостная сорбция при гнойно-воспалительных процессах: перитоните, абсцессах лёгких и печени [5, 6].

Углеродные сорбенты проявляют довольно высокую активность в отношении бактерий и их токсических продуктов, но нередко активны в отношении узкого спектра возбудителей. Повышение биоспецифических свойств возможно за счёт нанесения на поверхность сорбентов модификаторов — препаратов, проявляющих активность в отношении широкого спектра возбудителей, но не оказывающих отрицательного воздействия на организм. В качестве модификаторов применяются биологически активные вещества различной природы, обладающие антибактериальными и антимикотическими свойствами. Действие модифицированных сорбентов основано на совмещении адсорбционных свойств нанопористой углеродной матрицы и антибактериальных, антимикотических свойств модификаторов.

В Центре новых химических технологий ФГБУН «Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН» создан гранулированный сорбент на основе нанодисперсного углерода, обладающий высокой совместимостью с биологическими жидкостями и мезопористой структурой [7]. В Институте в течение последних лет ведутся исследования по созданию модифицированных углеродных сорбентов биологически активными

веществами (поливинилпирролидон, бетулин, молочная кислота, лизоцим и т. д.), обладающими антибактериальными и антимикотическими свойствами.

Цель исследования — изучить антибактериальные и антимикотические свойства углеродных сорбентов, модифицированных биологически активными веществами, в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

Материал и методы

Углеродный сорбент и его модифицированные образцы получены в Центре новых химических технологий Института катализа им. Г. К. Борескова СО РАН. В качестве модификаторов применяли поливинилпирролидон («Sigma-Aldrich», Германия), бетулин (ФГБУН Институт химии и химической технологии СО РАН, Красноярск), молочная кислота («Мосреактив», Россия), лизоцим (Sigma-Aldrich, Германия). Методика модифицирования углеродного сорбента (УМ) олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом МК-Л-УМ включает пропитку сорбента раствором молочной кислоты с последующей термообработкой, активацию поверхностных функциональных (карбоксильных) групп и иммобилизацию лизоцима на поверхности сорбента [8]. Модифицирование углеродного сорбента поли-N-винилпирролидоном совместно с бетулином (Б-ПВП-УМ) проводили путём пропитки углеродного материала раствором бетулина в N-винилпирролидоне с последующей полимеризацией (инициатор полимеризации — динитрил азобисизомасляной кислоты, ДИНИЗ) и термообработкой модифицированного сорбента в инертной среде [9].

В исследование включено 7 образцов сорбентов: образец № 1 — исходный гранулированный немодифицированный углеродный сорбент ВНИИТУ-1 (УМ); образец № 2 — сорбент, модифицированный 80% раствором молочной кислоты (МК); образец № 3 — сорбент, модифицированный бетулином (Б); образец № 4 — сорбент, модифицированный поливинил-N-пирролидоном (ПВП); образец № 5 — сорбент, модифицированный раствором лизоцима в ацетатном буфере; образец № 6 — гранулированный сорбент, модифицированный поли-N-винилпирролидоном с последующим нанесением бетулина (Б-ПВП-УМ); образец № 7 — сорбент, модифицированный молочной кислотой и лизоцимом (МК-Л-УМ).

В качестве тест-культур использовались следующие штаммы: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Escherichia coli* ATCC 25922 и ассоциация микроорганизмов — *Candida albicans* (клинический штамм) + *Escherichia coli* ATCC 25922. Выбор видов микроорганизмов обусловлен их наибольшей клинической значимостью в этиологии гнойно-воспалительных процессов, в том числе женской половой системы в соответствии с возможной сферой применения данных образцов. Состав тестируемой бактериально-грибковой ассоциации объясняется частой встречаемостью при рецидивирующем урогенитальном кандидозе.

Испытуемые образцы №№ 1–7 предварительно стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. Для тестирования использовали суточные культуры, выращенные на простом питательном агаре. Эталонные штаммы были проверены на чистоту и отсутствие диссоциаций; клинический штамм *C. albicans*, выделенный из биоматериала от пациентки с урогенитальным кандидозом, верифицирован методом Maldi-ToF масс-спектрометрии (Vitesc-MS). Суточную агаровую культуру исследуемых штаммов смывали стерильным физиологическим раствором, из полученной суспензии готовили взвеси микроорганизмов в концентрации 500 млн микробных тел в 1 мл раствора (0,5 ME по Mc Farland). Затем путём десятикратных разведений взвеси доводили до рабочей концентрации 10⁶/мл микроб-

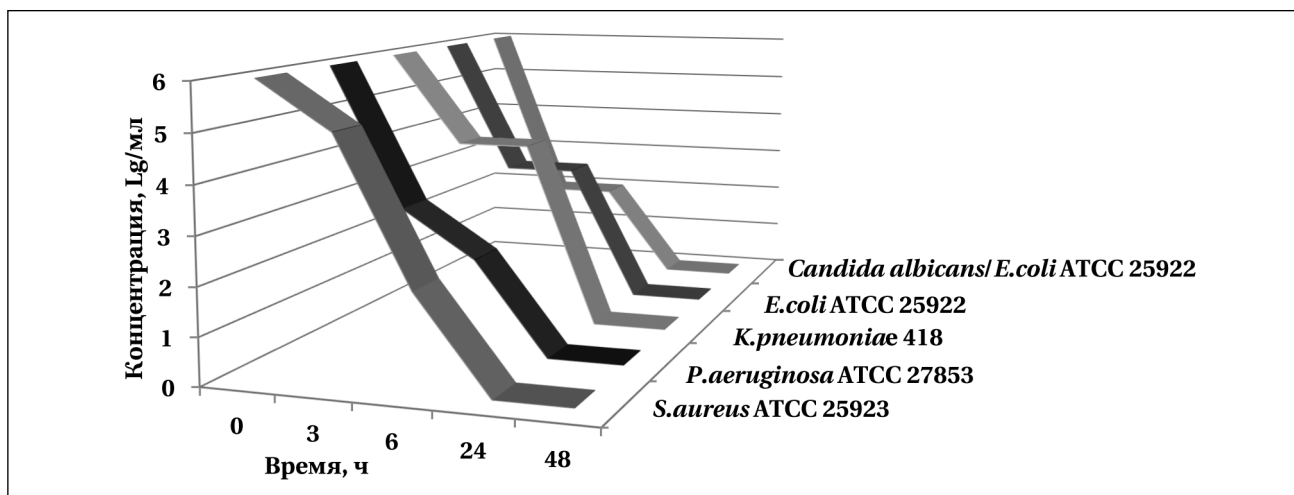


Рис. 1. Динамика снижения численности тест-микроорганизмов при испытании исходного образца.

ных тел. В лунки стерильного планшета помещали исследуемый образец, затем добавляли рабочую взвесь тест-культуры в количестве 2,0 мл до полного смачивания, ориентировочно 1:1. Смесь «образец — микроорганизм» тщательно перемешивали и инкубировали в термостате при температуре 37°C.

Выживаемость микроорганизмов определяли путём количественных высевов из каждой лунки смеси «образец — микроорганизм» через определённые промежутки времени термостатирования на чашки Петри с простым питательным агаром методом секторных посевов (Голда). На каждое сочетание «образец — микроорганизм» делали по три повторения параллельных высевов. Видовую принадлежность культур подтверждали результатами изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств.

Первый высев (контроль) делали сразу после добавления образца в взвесь микроорганизмов без термостатирования, далее через 3 — 6 — 24 — 48 ч инкубации. После инкубации чашек с простым питательным агаром при 37°C в течение 24 ч регистрировали наличие или отсутствие роста и количество микробных клеток в 1 мл смеси.

Результаты исследования

В качестве контроля на первом этапе было проведено изучение антибактериальной активности исходного образца углеродного сорбента ВНИИТУ-1.

Динамика снижения концентрации используемых тест-штаммов микроорганизмов при инкубации с исходным немодифицированным сорбентом представлена на рис. 1. При исходной концентрации 10^6 КОЕ/мл уже через 3 ч инкубации отмечалось снижение микробной нагрузки различной степени по видам микроорганизмов, которое продолжалось в течение 6 ч, и затем при высевах через 24 ч во всех случаях отмечалось полное отсутствие роста микроорганизмов. При этом следует отметить более медленное снижение концентрации представителей *Enterobacteriales* в сравнении с другими тест-штаммами.

Далее было проведено изучение используемых растворов модификаторов в отношении той же линейки возбудителей в аналогичном опыте. Наибольшую активность проявил исследуемый

раствор молочной кислоты (образец № 2 — МК). Отмечалось полное отсутствие роста всех изученных тест-штаммов при высевах уже через 3 ч инкубации. Результаты исследования действия образцов № 3 и № 4 (бетулин и поли-N-винилпирролидон) представлены в таблице. Видно, как постепенно снижались концентрации *S.aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *K.pneumoniae* 418 при инкубации с обоими образцами через 3 и 6 ч инкубации с полным исчезновением к 24 ч, что сопоставимо с активностью исходного образца немодифицированного углеродного сорбента. Вместе с тем, в смеси *E.coli* ATCC 25922 изолированно, а также в смеси *E.coli* + *C.albicans* микроорганизмы сохраняли жизнеспособность после инкубации с образцом № 4 через 24 ч инкубации, хотя и в минимальной концентрации, исчезая лишь через 48 ч. Образец № 3 существенно хуже действует на дрожжеподобные грибы рода *C.albicans* — отмечается сохранение жизнеспособных микроорганизмов даже через 48 ч.

Образец модификатора № 5 (раствор лизоцима в ацетатном буфере) показал ожидаемо высокую активность в отношении *S.aureus* ATCC 25923 — отсутствие роста наблюдалось уже через 6 ч инкубации. Также отмечалось отсутствие роста обоих микроорганизмов смеси *E.coli* + *C.albicans* через 3 ч. Остальные тест-штаммы подавлялись в течение 24 ч инкубации.

Результаты изучения модифицированных образцов сорбентов выявили следующее. Наиболее высокая антибактериальная/антимикотическая активность выявлена у образца № 7 — МК-Л-УМ: ни один из изученных штаммов микроорганизмов не был выявлен при высевах из смеси уже через 3 ч инкубации с образцом. Активность образца № 6 — Б-ПВП-УМ практически аналогична результатам испытания модификатора ПВП изолированно (см. таблицу) — отсутствие роста

Динамика изменения концентрации тест-штаммов микроорганизмов при инкубации с растворами модификаторов образцов № 3Б и № 4 ПВП

Тест-культуры	0 ч		3 ч		6 ч		24 ч		48 ч	
	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП	№3Б	№4ПВП
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ²	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>K.pneumoniae</i> 418	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	10 ³	10 ⁴	Роста нет	10 ²	Роста нет	Роста нет
Смесь <i>C.albicans</i> / <i>E.coli</i>	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵ /10 ⁵	10 ⁵ /10 ⁵	10 ³ /10 ²	10 ² /10 ³	10 ² /роста нет	10 ² /10 ²	10 ² /роста нет	Роста нет/роста нет

большинства тест-штаммов через 24 ч инкубации, *E.coli* изолированно и смеси *E.coli* + *C.albicans* — через 48 ч.

Наибольшая вариабельность при испытании модифицированных образцов выявлена в отношении дрожжеподобных грибов рода *Candida*, что демонстрирует рис. 2. Наибольшая антимикотическая активность выявлена у образца МК-Л-УМ — полное подавление роста через 3 ч; далее следует МК-УМ (6 ч). Образец Б-ПВП-УМ приводил к снижению концентрации *C.albicans* существенно медленнее, тем не менее через 48 ч рост уже не регистрировался.

Заключение

Таким образом, проведённые исследования выявили высокую антибактериальную и антимикотическую активность углеродных сорбентов, модифицированных комплексами биологически активных веществ образцов, по отношению к наиболее распространённым условно-патогенным возбудителям гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной и грибковой природы в сравнении с исходным немодифицированным образцом сорбента. Наибольшую антибактериальную и антимикотическую активностью проявил углеродный сорбент, модифицированный олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом. Механизм биоспецифической активности в данном случае, вероятно, связан с комбинацией сорбционного действия исходного сорбента и создания кислой среды молочной кислотой, неблагоприятной для большинства тестируе-

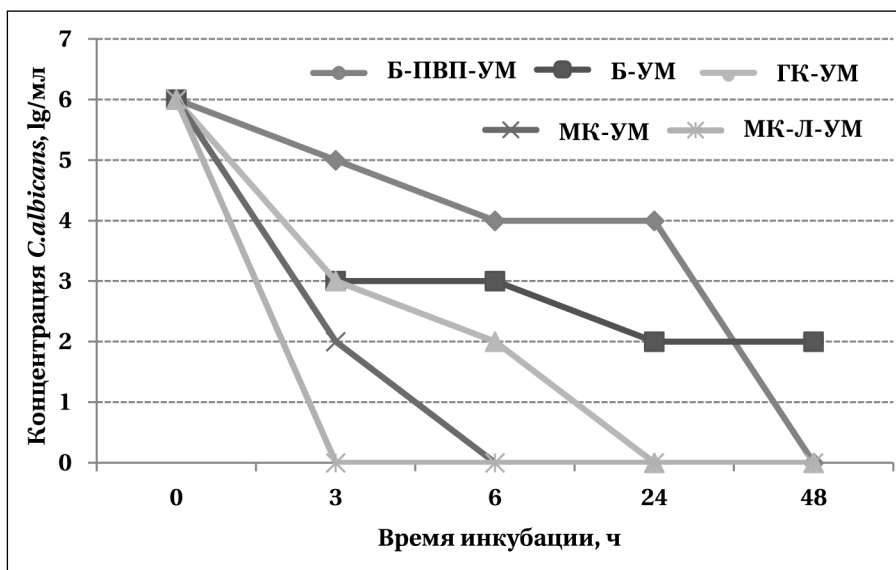


Рис. 2. Антимикотическая активность модифицированных образцов сорбентов в отношении *Candida albicans*.

мых возбудителей, в комплексе со специфической антимикробной активностью лизоцима.

Применение углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами молочной кислоты с иммобилизованным лизоцимом и поливинилпирролидоном совместно с бетулином, представляется наиболее перспективным для аппликационной терапии гнойно-воспалительных инфекций женской половой сферы ввиду высокой эффективности *in vitro* в стендовых испытаниях, а также физиологичного для вагинального биотопа механизма действия, сходного с механизмами защитного действия нормальной микрофлоры и местных факторов естественной неспецифической защиты.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект АААА-А19-119050790074-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Долгих В.Т., Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Долгих Т.И., Таран Н.И., Хвостунцев С.М. Использование углеродных сорбентов при критических состояниях организма. Омский научный вестник. — 2015. — № 2. — С. 19–22. / Dolgikh V.T., Pyanova L.G., Likholobov V.A., Dolgikh T.I., Taran N.I., Khvostuntsev S.M. Use of carbon sorbents in critical states of organism. Omsky Nauchniy Vestnik 2015; 2: 19–22 [in Russian]
- Ославский А.И. Сорбционные средства и методы в комплексном лечении гнойных ран (обзор литературы). Журнал Гродненского государственного медицинского университета. — 2016. — № 3. — С. 30–33. / Oslavsky A.I. Sorption Agents and Methods in Complex Treatment of Purulent Wounds (Literature Review). Zhurnal Grodnenskogo Gosudarstvennogo Meditsinskogo Universiteta 2016; 3: 30–33. [in Russian]

3. *Баринов С.В., Долгих В.Т., Долгих Т.И., Баракина О.В., Пьянова Л.Г.* Разработка и применение формованных углеродных сорбентов при лечении хронического эндометрита. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2014. — № 4. — С. 55–59. / *Barinov S.V., Dolgikh V.T., Dolgikh T.I., Barakina O.V., Pyanova L.G.* Development and application of molded carbon sorbents in the treatment of chronic endometritis. *Sibirsky Meditsinsky Zhurnal (Irkutsk)* 2014; 4: 55–59. [in Russian]
4. *Levashov P.A., Afanasieva O.I., Dmitrieva O.A. et al.* Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis. *Biochemistry* 2010; 4: 3: 303–307.
5. *Дибиров М.Д., Костюченко М.В., Елинсон В.М., Лямин А.Н.* Энтеросорбционная и экстракорпоральная коррекция гомеостатических нарушений в лечении острой абдоминальной хирургической патологии, осложнённой эндотоксикозом. Фундаментальные исследования. — 2012. — № 1 — С. 39–42. / *Dibirov M.D., Kostyuchenko M.V., Elinson V.M., Lyamin A.N.* Enterosorbational and extracorporeal correction of homeostatic disorders in the treatment of acute abdominal surgical pathology complicated by endotoxemia. *Fundamentalnye Issledovaniya* 2012; 1: 39–42. [in Russian]
6. *Долгих В.Т., Долгих Т.И., Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Баринов С.В., Баракина О.В., Гриценко Н.С., Толкач А.Б.* Антимикробная активность гранулированных углеродных сорбентов. Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т. 8. — № 3. — С. 788–791. / *Dolgikh V.T., Dolgikh T.I., Pyanova L.G., Likholobov V.A., Barinov S.V., Barakina O.V., Gritzenko N.S., Tolchach A.B.* Antimicrobial activity of granular carbon sorbents. *Russkiy Immunologicheskiy Zhurnal* 2014; 8: 788–791. [in Russian]
7. *Пьянова Л.Г., Бакланова О.Н., Лихолобов В.А.* Исследование эффекта модифицирования поверхности углеродных сорбентов поли-N-винилпирролидоном комплексом физико-химических и микробиологических методов. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2013. — Т. 49, № 4. — С. 408–417. / *Pyanova L.G., Baklanova O.N., Likholobov V.A. et al.* Investigation of the effect of surface modification of carbon sorbents with poly-N-vinylpyrrolidone by a complex of physicochemical and microbiological methods. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2013; 49: 4: 408–417. [in Russian]
8. *Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Дроздов В.А. и др.* Синтез и физико-химические свойства биоспецифического углеродного сорбента, модифицированного олигомерами молочной кислоты. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2017. — Т. 53. — № 4. — С. 368–374. / *Pyanova L.G., Likholobov V.A., Drozdov V.A. et al.* Synthesis and physicochemical properties of a biospecific carbon sorbent modified with lactic-acid oligomers. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2017; 53: 4: 369–374. [in Russian]
9. *Пьянова Л.Г., Дроздов В.А., Седанова А.В. и др.* Синтез модифицированных углеродных сорбентов и исследование их антиоксидантных свойств. Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2018. — Т. 54. — № 6. — С. 544–548. / *Pyanova L.G., Drozdov V.A., Sedanova A.V. et al.* Synthesis of Modified Carbon Sorbents and a Study of Their Antioxidant Properties. *Physikokhimiya Poverkhnosti i Zashchita Materialov* 2018; 54: 6: 544–548. [in Russian]

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Долгих Владимир Терентьевич — д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва

Пьянова Лидия Георгиевна — д. б. н., заведующая лабораторией синтеза функциональных углеродных материалов ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 417502

Наумкина Елена Витальевна — д. м. н., заведующая бактериологической лабораторией, Городской клинический перинатальный центр, Омск; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Омский государственный медицинский университет, Омск. Author ID: 753166

Лавренов Александр Валентинович — д. х. н., директор ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 363779

Матущенко Елена Валериевна — к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Омский государственный медицинский университет, Омск. Author ID: 654129

Корниенко Наталья Викторовна — младший научный сотрудник лаборатории синтеза функциональных углеродных материалов ЦНХТ ИК СО РАН, Омск. Author ID: 741459