

РЕФЕРАТ

Отчет 46 с, 13 рис., 31 табл., 25 источн.

МИЦЕЛИАЛЬНЫЕ ГРИБЫ, САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ХАЛКОНЫ, АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ, М-ТЕРФЕНИЛЫ, ДИФФУЗИОННЫЙ МЕТОД, СУСПЕНЗИОННЫЙ МЕТОД, БИОЦИД.

Объектами исследования являлись препараты с антимикробной активностью в виде растворов, а также производные халконов и м-терфенилов, используемые в качестве усилителей антимикробных средств.

Целью исследования являлся сравнительный анализ антимикробной активности классических биоцидов и циклических производных халконов. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи: определить антимикробную активность классических биоцидов по отношению к бактериям, дрожжам и мицелиальным грибам; определить антимикробную активность циклических производных халконов по отношению к бактериям, дрожжам и мицелиальным грибам; провести сравнительный анализ антимикробной активности классических биоцидов и циклических производных халконов.

В ходе выполнения исследования микробиологическими методами оценен биоцидный потенциал 26-ти новых модификаций халконов и 47-ми биоцидов по отношению к стандартным тест-организмам (санитарно-показательным бактериям, дрожжам и мицелиальным грибам). Выявлены наиболее перспективные образцы стандартных биоцидов и циклических модификаций халконов.

ВВЕДЕНИЕ

Биоцидные средства – вещество или смесь веществ, предназначенные для подавления роста вредных микроорганизмов, а также для профилактики вредного воздействия организмов.

В качестве биоцидных препаратов используют: спирты (этанол, пропанол, изопропанол), производные бигуанидина (хлоргексидин биглюконат), окислители (перекись водорода, перманганат калия), фенольные соединения (карболовая кислота), галогены (йод, хлор), производные нитрофурана (фурацилин) [1].

В данной работе в качестве биоцидных препаратов рассматриваются перекись водорода, хлоргексидин биглюконат, ПГМГ-ГХ, молочная кислота, высокомолекулярные соединения йода и ПВП и модификации халконов.

Перекись водорода (H_2O_2) – неорганическое соединение кислорода и водорода, относящееся к классу пероксидов. При стандартных условиях является бесцветной жидкостью, неограниченно растворима в воде, спирте и диэтиловом эфире. Сама перекись водорода является хорошим растворителем.

Молекула пероксида водорода сильно полярна, что приводит к возникновению водородных связей между молекулами. Связь между атомами кислорода непрочная, потому перекись водорода является неустойчивым соединением и легко разлагается. Поэтому при производстве концентрированных растворов перекиси водорода добавляют стабилизирующие добавки.

Концентрированные водные растворы пероксида водорода взрывоопасны. При попадании на кожу, слизистые оболочки и в дыхательные пути концентрированные растворы вызывают ожоги, которые сопровождаются белым налётом. Перекись водорода опасна при приёме внутрь, вызывает выраженные деструктивные изменения, сходные с действиями щелочей. Летальная доза 30 %-го раствора пероксида водорода (пергидроля) – 50–100 мл [2].

Перекись водорода выпускается в виде водных растворов 1–6 %, 30, 38, 50, 60, 85, 90, 98 %. 30 % водный раствор пероксида водорода, стабилизированный добавлением фосфатов натрия, называется пергидролем.

Механизм действия перекиси водорода

Антимикробное свойство перекиси водорода обусловлено строением молекулы: перекись водорода относится к реактивным формам кислорода и при повышенном образовании в клетке вызывает оксидативный стресс.

Оксидативный стресс – процесс повреждения клетки в результате окисления. Окислительный стресс отражает дисбаланс между проявлениями активных форм кислорода (АФК) в организме и способностью биологической системы своевременно очищать себя от интермедиатов реакции и восстанавливать причиненный ущерб. Нарушение окислительно-восстановительного статуса клеток приводит к токсическим последствиям, которые повреждают все компоненты клеток, в том числе белки, липиды и ДНК.

Химически самыми реакционноспособными при взаимодействии с перекисью водорода являются белки, в особенности сульфгидрильные группы, а также нуклеиновые кислоты (которые отсутствуют во внешней мембране).

Цитоплазматическая мембрана в своём составе содержит значительное количество белков, которые выполняют ферментативные и транспортные функции. Как только перекись водорода попадает на поверхность цитоплазматической мембраны (ЦПМ) происходит окисление транспортных белков, что нарушает барьерные функции и происходит утечка компонентов ЦПМ в периплазматическое пространство, а также перекись водорода может попасть внутрь клетки, где открывается доступ к нуклеиновым кислотам, ДНК и РНК, взаимодействие с которыми приводит к полной гибели клеток.

Действие перекиси водорода на бактерий различно из-за различного строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий. В общем можно сказать, что перекись водорода более активна в отношении грамположительных бактерий, чем грамотрицательных.

Перекись водорода также оказывает губительное действие и на эукариотическую клетку. В основном на цитоплазматическую мембрану дрожжеподобных грибов. ЦПМ эукариот в основе имеет липидный бислой, образованный в основном фосфолипидами. Перекись водорода вызывает окисление липидов мембраны с образованием перекиси липидов. Перекиси липидов представляют собой высокотоксичные соединения: они вызывают окисление тиоловых соединений и SH-групп белков, денатурацию белков, подавляют активность ферментов и изменяют их субстратную специфичность, тормозят гликолиз и цикл трикарбоновых кислот и разобщают окислительное фосфорилирование. Всё это приводит к гибели одноклеточных и многоклеточных организмов.

Хлоргексидин относится к лекарственным препаратам, антисептик, в готовых лекарственных формах используется в виде биглюконата. Обладает антимикробной активностью по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, простейшим, вирусам и грибам. На споры бактерий действует только при повышенных температурах (рисунок 1.1) [3].

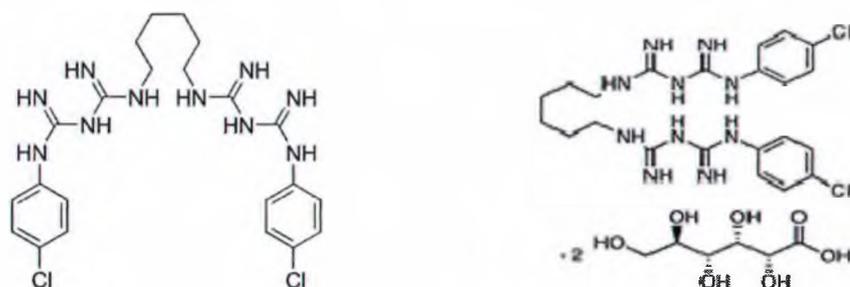


Рисунок 1.1 – Молекулярная формула хлоргексидина и хлоргексидина биглюконата

Отличительная черта хлоргексидина биглюконата (ХГ) – его стабильность и продолжительность действия после применения, в отличие от той же перекиси водорода. После обработки ХГ сохраняется на поверхности в некотором количестве, достаточном для проявления антисептического действия. Также сохраняет активность (несколько сниженную) в присутствии крови, гноя, различных органических веществ [4].

Субстанция хлоргексидина биглюконата выпускается в виде 20 %-го водного раствора. Готовое к применению лекарственное средство представляет собой менее концентрированный водный или водно-спиртовой раствор.

Применяют для обработки операционного поля и рук хирурга, дезинфекции хирургических инструментов, при гнойно-септических процессах (промывание операционных ран, мочевого пузыря и др.) и для профилактики венерических болезней (сифилис, гонорея, трихомоноз) [3]. В качестве активного компонента используют в различных препаратах для лечения и профилактики инфекций.

Механизм действия хлоргексидина биглюконата

Хлоргексидин биглюконат является хлорсодержащим производным бигуанида. Механизм действия на клетки микроорганизмов основан на способности изменять свойства клеточной мембраны. Хлоргексидин диссоциирует с образованием катионов, которые взаимодействуют с фосфатными группами отрицательно заряженной поверхности клеток. При этом происходит дезагрегация липопротеиновой мембраны, что приводит к нарушению осмотического равновесия. В результате из клетки выходят калий и фосфор, разрушается ЦПМ, и клетка гибнет.

Помимо бактериостатического и бактерицидного действия, хлоргексидин обладает также фунгистатическим, фунгицидным и некоторым противовирусным эффектом, но мало активен в отношении кислотоустойчивых бактерий и бактериальных спор. В связи с тем, что хлоргексидин имеет более высокое сродство к клеточной стенке грамположительных микроорганизмов, минимальная ингибирующая концентрация для грамположительных бактерий ниже, чем для грамотрицательных [5].

ПГМГ (Полигексаметиленгуанидин) – производное гуанидина, в основном используемого в качестве биоцидного дезинфектанта, в основном в форме солей фосфата (ПГМГ-Ф) или гидрохлорида (ПГМГ-ГХ, метацид) [6], является аналогом хлоргексидина и обладает фунгицидным и бактерицидным свойствами.

ПГМГ-ГХ (рисунок 1.2) – вещество без цвета и запаха, в основном синтезируется в виде кристаллов хорошо растворимых в воде. Является пожаробезопасным и взрывобезопасным веществом, сохраняет свои свойства в широком диапазоне температур, так как не испаряется при кипячении, не является окислителем, поэтому не вызывает коррозию металлов. Как и ХГ после обработки сохраняет свои антимикробные свойства.

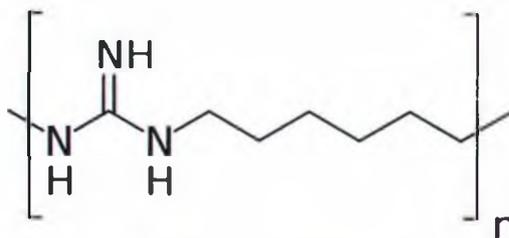


Рисунок 1.2 – Молекулярная формула ПГМГ

ПГМГ-ГХ используется как активный компонент в антисептических препаратах, а также как отдельное средство в виде кристаллов для профилактической дезинфекции поверхностей: в поликлиниках, больницах, в местах общественного пользования и большого скопления людей, на предприятиях пищевой промышленности и тд.

Выпускают в виде гранул, где содержания ПГМГ-ГХ 95–98 %, или в виде водного 20 %-го раствора. При необходимости производят 50 %-ый водный раствор.

Механизм действия ПГМГ-ГХ

ПГМГ-ГХ относится к биоцидным препаратам широкого спектра антимикробного действия в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов, грибов и дрожжей.

В основе ПГМГ лежит гуанидин. Гуанидиновые поликатионы адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности бактериальной клетки, блокируя тем самым дыхание, питание, транспорт метаболитов через клеточную стенку бактерий. Макромолекулы полиалкиленгуанидина (ПАГ) дифундируют через стенку клетки, вызывая необратимые структурные повреждения в цитоплазматической мембране, нуклеотида, цитоплазмы. ПАГ способны связываться с фосфолипидами, белками ЦПМ, что приводит к её разрушению [7].

Так как в состав ПГМГ-ГХ входит гидрохлорид, после проникновения вещества в клетку происходит блокировка синтеза РНК и ДНК. Всё вышесказанное приводит к гибели микробной клетки.

Молочная кислота (C₃H₆O₃) – органическое вещество, относящееся к классу карбоновых кислот. При стандартных условиях является жидкостью белого цвета с характерным запахом.

Молочная кислота используется в различных отраслях промышленности: пищевая промышленности (как консервант и подкислитель, а лактат кальция добавляют как источник кальция), косметическая промышленность, фармацевтическая, кожевенная и химическая. На производственных и перерабатывающих предприятиях пищевая молочная кислота известна как E270.

Молочная кислота также является компонентом: чистящих средств, предназначенных для различных типов поверхностей; шампуней, кремов, гелей, мазей и антибактериальных, противовоспалительных, противозудных препаратов; растворов в пчеловодстве против клещей, поражающих ульи; корма для животных. В качестве натурального дубильного вещества также

используется для обработки шкур животных и обработки текстильных изделий [8].

Как отдельный компонент в биоцидных препаратах молочная кислота имеет не очень высокий антибактериальный эффект, но в сочетании с анионными и неионогенными ПАВ биоцидные свойства возрастают.

Механизм действия молочной кислоты

Антимикробный эффект при применении молочной кислоты обусловлен тем, что при воздействии молочной кислоты на клетку бактерий происходит утечка белков клетки, что разрушает цитоплазматическую мембрану и саму клетку в целом [8].

Но многие исследования доказали, что молочная кислота является слабым биоцидным препаратом, но хорошей консервирующей добавкой. Также её добавляют в различные биоцидные средства в качестве стабилизатора.

Биоцидная активность молочной кислоты значительно усиливается в комплексе ПАВ. Амфотерные ПАВ, проникая в прокариотическую клетку, ингибируют специфические ДНК-азы, чем затрудняют формирование ДНК. Также ПАВ аминируют фосфолипиды мембраны клеток, приводя к разрушению клеток бактерий. Ионогенные ПАВ разрушают клеточные мембраны, приводят к денатурации клеточных белков и инактивации ферментов [9].

Высокомолекулярные соединения йода и ПВП (Повидон-йод) – лекарственное средство, антисептик для местного применения. Представляет собой соединение йода с поливинилпирролидоном (ПВП), где концентрация активного йода в комплексе 0,1–1 %. Повидон-йод – жёлто-коричневый порошок без запаха или со слабым запахом, хорошо растворим в воде и спирте. На рисунке 1.3 представлена молекулярная формула повидон-йод.

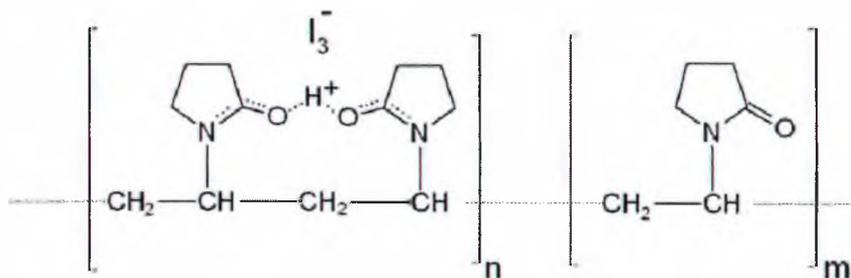


Рисунок 1.3 – Молекулярная формула Повидон-йод

Обладает антисептическим, дезинфицирующим, бактерицидным, противогрибковым и противовирусным действиями. Не имеет резистентности (привыкания) [10]. Повидон-йод обладает широким спектром действия в отношении различных микроорганизмов. На поверхности образует видимую плёнку, что обеспечивает продолжительность его действия.

Механизм действия высокомолекулярные соединения йода и ПВП

Повидон-йод обладает широким спектром противомикробного действия, активен в отношении бактерий, грибов, вирусов, простейших. Биоцидная способность данного препарата основана на его способности взаимодей-

ствовать с белками клеточной стенки микроорганизмов, а также с ферментами, с образованием йодаминов, что вызывает гибель клеток [11].

Халконы — это объединенная группа кетонов (флавоноидов), которая имеет в своем составе системы с открытой цепью с сопряженными двойными связями и полностью делокализованной системой π -электронов на бензольных кольцах и трехуглеродную, α,β -ненасыщенную карбонильную систему, соединяющей два ароматических кольца А и В (рисунок 1.4) [12]. Они вырабатываются некоторыми видами растений, такими как *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* и *Scutellaria* в качестве предшественников для биосинтеза флавоноидов и изофлавоноидов и промежуточных продуктов для синтеза гетероциклических соединений с биологически значимыми свойствами, такими как пиразолины, изоксазолы, цианопиридины и пиримидины.

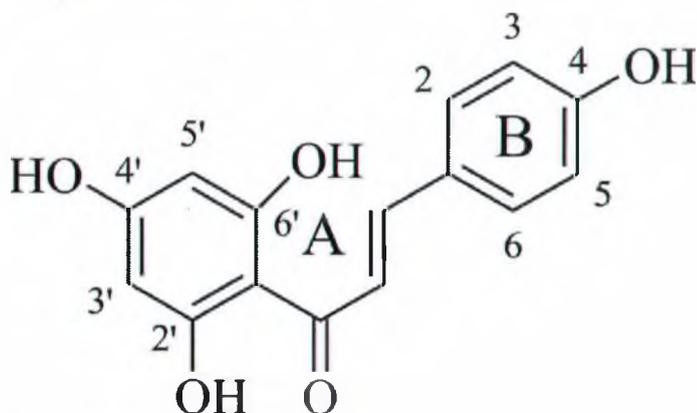


Рисунок 1.4— Структура молекулы халкона.

Халконы являются частью наиболее известного класса вторичных метаболитов растений. Они используются в защитных механизмах растений для борьбы с химически активными видами кислорода, чтобы растение могло выжить и предотвратить молекулярные повреждения, а также повреждения, вызванные микроорганизмами, насекомыми и животными [13]. Кроме того, халконы могут быть химически синтезированы в лаборатории с помощью реакции Клайзена-Шмидта или альдольной конденсации [14]. Считается, что халконы обладают множеством полезных свойств, например, противовоспалительными, антибактериальными, противогрибковыми, антидиабетическими и противораковыми свойствами.

Термин «халкон» часто используется для обозначения молекул, которые содержат 1,3-дифенилпроп-2-ен-1-он и используются в качестве промежуточных продуктов при производстве флавоноидов [15], а также являются одним из основных классов флавоноидов.

Они относятся к полифенольным соединениям, которые имеют желтую или оранжевую окраску и используются для получения флавоноидов и изофлавоноидов. Имея два ароматических кольца, соединенных трехуглеродной ненасыщенной карбонильной системой, они могут встречаться в виде транс- (E) или цис- (Z) изомеров. Поскольку изомер (E) в большинстве случа-

ев термодинамически более стабилен, он является наиболее распространенной структурой среди халконов. Конформация (Z) изомера нестабильна из-за существенных стерических взаимодействий между карбонильной группой и А-кольцом [16]. Молекулы с такой структурой имеют более низкие окислительно-восстановительные потенциалы и с большей вероятностью взаимодействуют с электронами посредством переноса электронов.

Халконы и их производные показали ингибирующий эффект против метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) [17] благодаря наличию ОН-групп в кольце В и липофильного свойства кольца А (рисунок 1.4) [18].

Кроме того, некоторые производные халконов проявили противогрибковую активность, в частности, против *Microsporium gypseum* [19]. Они ингибируют β -(1, 3)-глюкан и хитин-синтазы, ответственные за формирование и нормальное функционирование клеточной стенки грибов [20].

Механизм действия производных халконов

Благодаря наличию в составе реакционноспособной α, β -ненасыщенной системы, халконы являются антибактериальными веществами с умеренной или высокой активностью. Их способность изменять свою структуру путем присоединения к ароматическому кольцу различных типов групп заместителей позволяет потенциально достичь более высокой эффективности, низкой токсичности и более широкого спектра антибактериальной активности [21].

Халконы характеризуются широким спектром биологической активности, возможно связанным с их небольшими размерами и специфичными свойствами, делающими их толерантными к различным биологическим молекулам и позволяющим им реагировать с ними [22]. Например, они проявляют значительную активность в отношении разнообразных опухолей и имеют хемопротекторные свойства. Это можно связать с их антиоксидантной активностью [23].

Изучив механизмы действия активных компонентов антимикробных средств, можно сделать вывод, что практически все биоцидные препараты действуют на цитоплазматическую мембрану клетки, разрушают её и приводят к гибели микроорганизмов. Производные халконов характеризуются способностью повышать проницаемость мембран микроорганизмов для других антимикробных агентов. Также практически все биоцидные препараты действуют на ферменты и белки клетки, нарушают репликацию ДНК и РНК.

Высокая биологическая активность и синергический эффект, проявляемые халконами, обуславливают интерес исследователей к этим соединениям, поэтому основной целью НИР 17-23 стало изучение антимикробной активности производных халконов и сравнение ее с биоцидным потенциалом классических антимикробных веществ.