

© Коллектив авторов, 2017
УДК [615.46.014.47:615.28]:546.26

Долгих В.Т.¹, Пьянова Л.Г.², Долгих Т.И.¹, Лихолобов В.А.²,
Корпачева О.В.¹, Седанова А.В.², Золотов А.Н.¹, Таран Н.И.¹

Антибактериальная активность гранулированных углеродных сорбентов

¹ ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», 644099, г. Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

² ФАНО «Институт проблем переработки углеводородов» СО РАН, 644040, г. Омск, Россия, ул. Нефтезаводская, д. 54

Цель исследования — изучение антибактериальной активности гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре в условиях различной продолжительности контакта с сорбентом. **Методика.** Исследовали антибактериальные свойства гранулированного сорбента ВНИИТУ-1, обработанного гидромеханически, окисленного и стабилизированного до нормативных значений рН и модифицированного поли-N-винилпирролидоном (ПВП) ВНИИТУ-1 по отношению к патогенным микроорганизмам: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, а также к их смесям. Все микроорганизмы представляли собой клинические штаммы, выделенные из ран пациентов. Предварительно тест-микроорганизмы были исследованы на чувствительность к современным антибиотикам. Опытным путем подбирали такие разведения и количество засеваемого материала, чтобы выросшие на чашке Петри колонии можно было сосчитать. Бактерии сорбировали из физиологического раствора с концентрацией микробных клеток 3×10^3 колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемой пробы (КОЕ/мл). В пробирку типа Эпшендорф вносили сорбент в количестве 0,5 мл, добавляли 1 мл микробной взвеси, встряхивали для удаления пузырьков воздуха и выдерживали в термостате в течение 1, 3, 6 и 24 ч. По истечении заданного времени контакта сорбента с патогенной микрофлорой отбирали надосадочную жидкость в объеме 100 мкл, засекали на стерильные агаровые пластины чашек Петри с питательной средой ГМФ-агар. Засеянные чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор 15АС (Япония) вверх дном и инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. При подсчете колоний, выросших на чашке Петри, учитывали только те чашки, на которых выросло более 300 изолированных колоний. **Результаты.** Гранулированный сорбент ВНИИТУ-1 обладает антибактериальным действием в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также их смеси. Сроки проявления антибактериального эффекта сорбента зависят от вида микроорганизмов и времени их контакта с образцом. Присутствие в составе сорбента модификатора ПВП усиливает его антибактериальные свойства. Полимермодифицированный образец обладает пролонгированным антибактериальным эффектом в отношении широкого спектра микроорганизмов (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *St. aureus*) и смеси их культур. **Заключение.** Показана возможность повышения антибактериальных свойств гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре путем их модификации поли-N-винилпирролидоном. Дальнейшая разработка и применение углеродных сорбентов как средств сорбционной терапии является перспективным подходом к местному лечению гнойных ран.

Ключевые слова: углеродные сорбенты гранулированные, раневая инфекция, стендовые микробиологические испытания, антибактериальная активность.

Для цитирования: Долгих В.Т., Пьянова Л.Г., Долгих Т.И., Лихолобов В.А., Корпачева О.В., Седанова А.В., Золотов А.Н., Таран Н.И. Антибактериальная активность гранулированных углеродных сорбентов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61 (3): 76–82.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.76-82

Для корреспонденции: Долгих Владимир Терентьевич, доктор мед. наук, проф., заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. патофизиологии, клинической патофизиологии, e-mail: prof_dolgh@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.10.2016

Dolgikh V.T.¹, Pjanova L.G.², Dolgikh T.I.¹, Licholobov V.A.²,
Korpacheva O.V.¹, Sedanova A.V.², Zolotov A.N.¹, Taran N.I.¹

Antibacterial activity of granulated carbon sorbents

¹ Omsk State Medical University, Ministry of Public Health; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russia

² Institute for Hydrocarbon Processing, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 54, ul. Neftozavodskaja, Omsk, 644040, Russia

The purpose: Study the antibacterial activity of granulated carbon sorbents in relation to the pathogenic microflora under the conditions of different period of contact with sorbent. **Methods.** It has been investigated the antibacterial properties

of VNIITU-1 granulated sorbent, which was hydromechanically treated, oxidized and stabilized up to pH standard parameters and VNIITU-1 modified poly-N-vinylpyrrolidone (PVP) against the pathogenic micro-organisms, including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, and their mixes. All bacteria were clinical strains derived from the wounds of patients. Dilutions and amount of inoculated material were experimentally selected for further calculation of the grown colonies on the Petri dish. Bacteria were sorbed from the saline solution with bacteria concentration of 3×10^3 of the colony forming units in 1 ml of test sample (CFU/ml). Eppendorf tube was added the sorbent 0.5 ml and bacterial suspension 1 ml; then the tube was shaken to remove the air bubbles and incubated for 1, 3, 6 and 24 hr. Upon the expiry of the target time for sorbent with pathogenic flora contact the supernatant fluid was collected in 100 μ l and inoculated on the sterile agar plates of the Petri dishes with GMF agar nutrient medium. Inoculated Petri dishes were placed upside down in CO₂ incubator 15AC (Japan) and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hours. When counting the colonies growing on the Petri dish, they took into consideration only the dishes where more than 300 isolated colonies were grown. If more than 300 colonies were grown, « $> 3 \times 10^2$ CFU/ml» was recorded in the protocol. **Results.** Granulated sorbent VNIITU-1 has an antibacterial effect against both gram-positive and gram-negative bacteria, and their mixes. Time period for manifestations of the sorbent antibacterial effect depends on the type of microorganisms and time of contact. PVP presence in sorbent composition enhances the antibacterial effect of the sorbent. Resin-modified sample has a prolonged antibacterial effect against a broad spectrum of microorganisms (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* and *St. aureus*) and mixtures of their cultures. **Conclusion.** It has been determined the possibility for increasing of antibacterial properties of granulated carbon sorbents against the pathogenic microflora by their modification with poly-N-vinylpyrrolidone. Further development and application of carbon sorbents as the means for sorption therapy is a perspective approach for the local treatment of purulent wounds.

Keywords: granulated carbon sorbents; wound infection; bench microbiological tests; antibacterial activity.

For citation: Dolgikh V.T., Pjanova L.G., Dolgikh T.I., Licholobov V.A., Korpacheva O.V., Sedanova A.V., Zolotov A.N., Taran N.I. Antibacterial activity of granulated carbon sorbents. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2017; 61(3): 76–82. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.76-82*

For correspondence: Vladimir T. Dolgikh, MD, PhD Dsc in Medicine, Honoured Scientist of the Russian Federation, Head of Department of the Pathophysiology, Clinical Pathophysiology of Omsk State Medical University; e-mail: prof_dolgih@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

The transparency of the study. The research had no sponsorship. Researchers nest responsibility for providing the final version of the manuscript in print.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Dolgikh V.T., <http://orcid.org/0000-0001-9034-4912>
Pjanova L.G., <http://orcid.org/0000-0002-6702-0878>
Dolgikh T.I., <http://orcid.org/0000-0001-6005-966X>
Likholobov V.A., <http://orcid.org/0000-0002-6433-6756>
Korpacheva O.V., <http://orcid.org/0000-0001-6110-3933>
Sedanova A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1832-253X>
Zolotov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6775-323X>
Taran N.I., <http://orcid.org/0000-0001-8321-6314>

Received 25.10.2016

Введение

В основе лечения больных с раневой инфекцией лежит этиотропная терапия. Однако применение антибактериальных препаратов обладает рядом нежелательных эффектов, увеличивает число антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, нарушает микробиоценоз [1—3]. В связи с этим лечение больных с раневой инфекцией и тяжелыми гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы требует поиска новых подходов и препаратов, отличающиеся по механизму действия от антибиотиков, а значит, лишенных их недостатков, и обладающих в то же

время высокой антибактериальной активностью. Одним из приоритетных направлений лечения больных с раневой инфекцией является сорбционная терапия, в частности аппликационная сорбция (вulnerable сорбция) [4, 5].

Перспективным методом создания материалов с антибактериальными свойствами представляется их модификация с помощью веществ, обладающих дезинтоксикационными и антимикробными свойствами. С этой целью используют биосовместимые полимеры, в частности низкомолекулярный поли-N-винилпирролидон (ПВП) медицинского назначения. Этот

полимер нетоксичен, хорошо растворим в воде и биологических жидкостях, обладает дезинтоксикационными, антибактериальными и антисептическими свойствами [6].

В Институте проблем переработки углеводов СО РАН на основе нанодисперсного углерода создан гранулированный с мезопористой структурой сорбент медицинского назначения ВНИИТУ-1, обладающий высокой химической чистотой, практически полным отсутствием пылевидных частиц на поверхности и в порах и высокой совместимостью с биологическими жидкостями [7]. Свойства ВНИИТУ-1 дают основания предполагать наличие у него антибактериальной активности. Подтверждение этого предположения позволит разрабатывать на его основе сорбенты медицинского назначения — средства сорбционной терапии для местного лечения больных гнойно-септическими заболеваниями бактериальной природы.

Цель исследования — изучение антибактериальной активности гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной микрофлоре в условиях различной продолжительности контакта с сорбентом.

Методика

Исследовали антибактериальные свойства гранулированного сорбента ВНИИТУ-1, обработанного гидромеханически, окисленного и стабилизированного до нормативных значений рН (образец I) и модифицированного поли-N-винилпирролидоном (ПВП) ВНИИТУ-1 (образец II) по отношению к патогенным микроорганизмам: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, а также к их смесям. Смесь I — *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, смесь II — *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Все микроорганизмы представляли собой клинические штаммы, выделенные из ран пациентов. Идентификацию бактерий проводили на тест-системах производства PLIVA (Lachema Diagnostica, Чехия) в компьютерной программе «МИКРОБ Автомат». Предварительно тест-микроорганизмы были исследованы на чувствительность к современным ан-

тибиотикам (диски с антибиотиками компании Becton Dickinson and Company, USA, производство Ireland Benex Limited).

Опытным путем подбирали такие разведения и количество засеваемого материала, чтобы выросшие на чашке Петри колонии можно было сосчитать. Контролем служили посеvy рабочих разведений испытуемых культур. Концентрацию микробных клеток определяли на приборе для исследования мутности суспензий *Densi-La-Meter* (PLIVA-Lachema, Италия). Исследуемые смеси испытуемых культур готовили смешиванием равных объемов приготовленных рабочих концентраций микробных клеток последующим перемешиванием на вортекс-встряхивателе. Бактерии сорбировали из физиологического раствора с концентрацией микробных клеток 3×10^3 колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемой пробы (КОЕ/мл). В пробирку типа Эппендорф вносили сорбент в количестве 0,5 мл, добавляли 1 мл микробной взвеси, встряхивали для удаления пузырьков воздуха и выдерживали в термостате в течение 1, 3, 6 и 24 ч. Все работы проводили в ламинарном боксе БОВ-001-АМС.

По истечении заданного времени контакта сорбента с микрофлорой отбирали надосадочную жидкость в объеме 100 мкл, засекали на стерильные агаровые пластины чашек Петри с питательной средой ГМФ-агар (ЗАО НИЦФ, Санкт-Петербург). По истечении 1 ч контакта микрофлоры с сорбентом перед отбором надосадочной жидкости суспензии в пробирках перемешивали. Засеянные чашки Петри помещали в CO₂-инкубатор 15АС (Япония) вверх дном и инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. При подсчете колоний, выросших на чашке Петри, учитывали только те чашки, на которых выросло более 300 изолированных колоний. Если выросло более 300 колоний, то в протоколе отмечали « $>3 \times 10^2$ КОЕ/мл». Количество колоний на чашках двух параллельных испытаний суммировали и рассчитывали средний результат. Полученный результат выражали в КОЕ/мл. Если подсчет колоний на чашках оказывался невозможным, то в протоколе отмечали «сливной рост». Если количество колоний было сопоставимо и больше по сравнению с контролем, то в протоколе отмечали «сопоставим с контролем» или «выше, чем в контроле» соответственно.

Таблица

Антибактериальные свойства образцов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам

Образцы сорбента	Контроль	Время контакта с сорбентом, ч				Контроль	Время контакта с сорбентом, ч			
		1	3	6	24		1	3	6	24
		Staphylococcus aureus, число колоний				Streptococcus agalactiae, число колоний				
I	10 ³	10 ³	>3 × 10 ²	>3 × 10 ²	2 × 10 ²	10 ³	10 ³	20	20	20
II	10 ³	10 ³	10 ³	>3 × 10 ²	0	10 ³	0	0	0	0

Результаты и обсуждение

Результаты испытаний антибактериальных свойств углеродных сорбентов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам представлены в таблице и на рис. 1.

На снимках чашки Петри расположены по возрасту времени контакта сорбента с патогенной микрофлорой после контрольного посева (обозначен как «контроль»).

Представленные данные свидетельствуют о том, что образцы углеродного сорбента I и II обладают антибактериальным действием в отношении грамположительных бактерий. Сроки проявления антибактериального эффекта сорбентов зависят от вида микроорганизмов, времени их контакта с образцом и присутствия в составе сорбента модификатора ПВП. Так, антибактериальный эффект образца I в отношении *St. aureus* регистрируется уже после 3 ч контакта с сорбентом, а для проявления антибактериального эффекта образца II требуется продолжительность контакта не менее 6 ч. Через 24 ч после контакта образца II с тест-микроорганизмами *St. aureus* полностью подавля-

ется их рост. В отношении *St. agalactiae* оба образца оказались более эффективными: образец I подавляет рост тест-микроорганизмов по истечении 3 ч контакта, а образец II — уже через 1 ч воздействия (рис. 1).

Таким образом, стендовыми микробиологическими исследованиями установлено, что гранулированный углеродный сорбент ВНИИТУ-1 обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов. Присутствие в структуре сорбента модификатора поли-N-винилпирролидона усиливает его антибактериальный эффект.

При исследовании антибактериальных свойств образца I по отношению к смеси тест-микроорганизмов установлено (рис. 2), что при контакте со смесью культур № 1 (*E. coli* и *St. aureus*) наблюдается постепенное снижение роста колоний грамположительных бактерий *S. Aureus* по истечении 6 ч контакта. При контакте со смесью культур № 2 (*P. aeruginosa* и *St. aureus*) отмечается небольшое снижение роста колоний для *P. aeruginosa* по истечении 6 ч контакта. По истечении 24 ч контакта отмечен «скудный рост» патогенной микрофлоры обеих смесей тест-микроорганизмов (№ 1 и № 2).

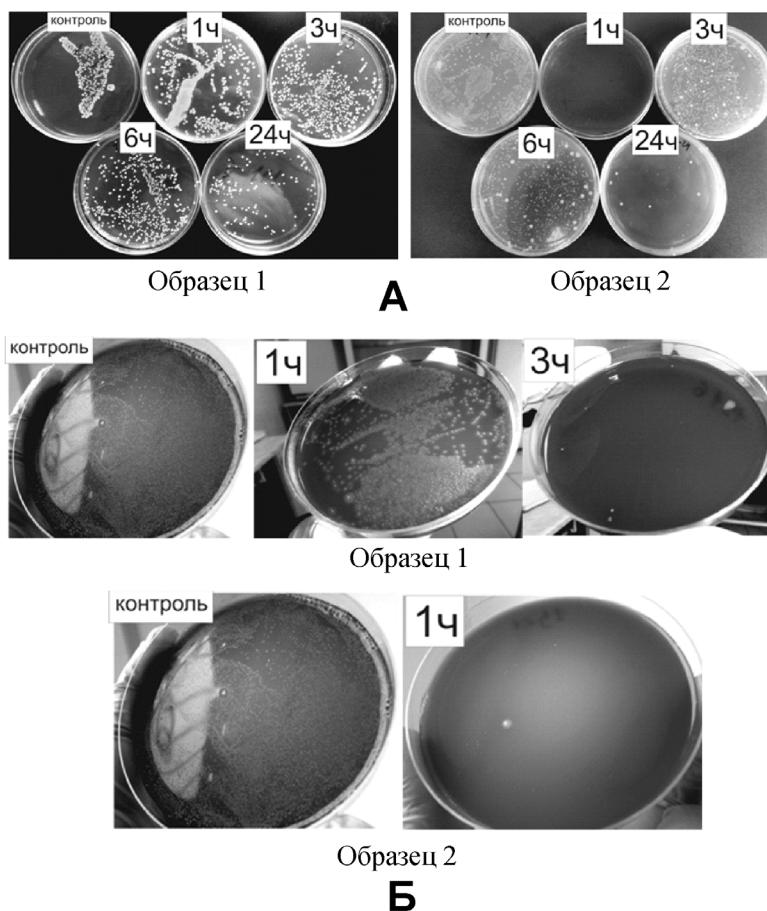


Рис. 1. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к грамположительным тест-микроорганизмам *S. aureus* (А) и *S. agalactiae* (Б).

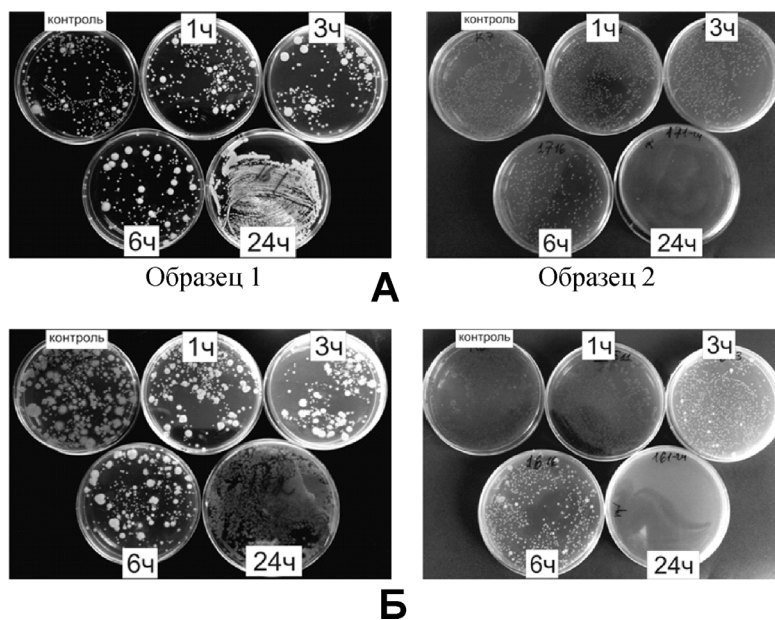


Рис. 2. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к смеси культур *E. coli* и *S. aureus* (А) и *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Б).

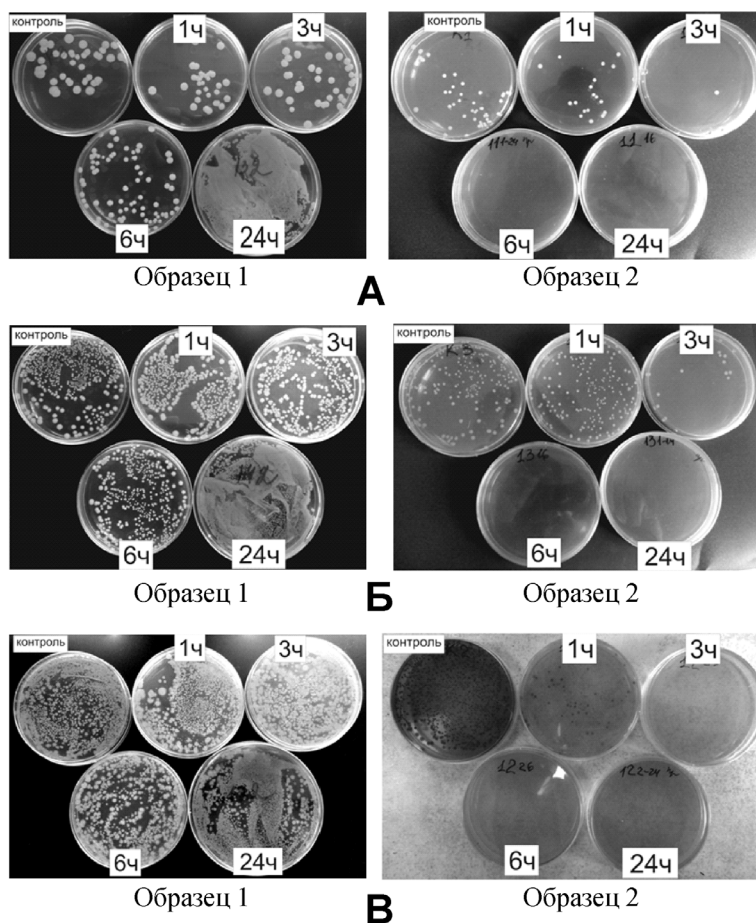


Рис. 3. Результаты исследования антибактериальных свойств образцов по отношению к грамотрицательным тест-микроорганизмам *K. pneumonia* (А), *E. coli* (Б) и *P. aeruginosa* (В).

При исследовании антибактериальных свойств образца II выявлена его выраженная антибактериальная активность по отношению к грамотрицательной микрофлоре: рост колоний тест-микроорганизмов *E. coli* отсутствовал по истечении 6 ч контакта с сорбентом, а рост *K. pneumonia* и *P. aeruginosa* прекращается уже по истечении 3 ч контакта (рис. 3). Таким образом, эффективность модифицированного образца II по отношению к грамотрицательным микроорганизмам можно расположить в ряду следующим образом: *K. pneumonia* > *P. aeruginosa* > *E. coli*.

Изучение антибактериальных свойств образца II по отношению к смеси тест-микроорганизмов подтвердило его высокую антибактериальную активность (рис. 3). Так по истечении 1-го ч контакта сорбента с микрофлорой постепенно снижается рост колоний *E. coli* (смесь культур № 1) *P. aeruginosa* (смесь культур № 2). Рост культуры *St. aureus* в составе смеси не изменяется в течение первых 6 ч контакта с сорбентом. По истечении 24 ч контакта сорбента с патогенной микрофлорой зарегистрировано отсутствие роста тест-микроорганизмов в обеих смесях культур.

Повышение антибактериальных свойств модифицированного сорбента II можно объяснить введением в его состав ПВП, который на 5—15% усиливает его антибактериальные свойства [7, 8]. Антибактериальные свойства ПВП обусловлены его строением и наличием в его структуре лактамного кольца. Бактериальные клетки взаимодействуют с атомом азота пирролидоновых циклов ПВП. Благодаря наличию гидрофобной полимерной цепи и гидрофильных карбонильных групп в структуре ПВП возможно физическое связывание бактериальных клеток с полимерной матрицей (адгезия). Кроме того, связывание может быть обусловлено кулоновским взаимодействием отрицательно заряженной мембраны бактериальной клетки и положительно заряженным протонированным атомом азота в макромолекуле полимера.

Примечательно, что ПВП и β -лактамы антибиотиков имеют схожее строение. По соответствующей классификации ПВП относится к γ -лактамам. Можно предположить, что полимермодифицированный углеродный сорбент (образец II) действует в отношении патогенной микрофлоры подобно β -лактамам антибиотикам, проявляя бактерицидные свойства.

Известно, что бактерии постепенно вырабатывают устойчивость к β -лактамам антибиотикам за счет синтеза и действия лактамаз (группа бактериальных ферментов, направленных на борьбу с β -лактамами антибиотиками). В отличие от β -лактамов антибиотиков, γ -лактамное кольцо в ПВП менее доступно для «атак» лактамаз, и количество таких центров в полимере значительно превышает концентрацию ферментов, вырабатываемых бактериями.

Подобранные условия синтеза позволили получить сорбент пролонгированного действия. С течением времени полимер при контакте с биологической средой мигрирует (десорбируется) с сорбента в виде полимерных цепей и способен в данной форме взаимодействовать с бактериальными клетками. Возможность удаления (десорбции, миграции) полимера-модификатора с поверхности образца II доказана проведенными в ИППУ СО РАН исследованиями с использованием физико-химических методов [7, 8]. Сравнение антибактериальных свойств модифицированного образца II и современных антибиотиков показало, что полимермодифицированный образец II не только может служить альтернативой антибиотикам, но и обладает заметным преимуществом перед ними [8].

На основании проведенных исследований показана возможность повышения антибактериальных свойств гранулированных углеродных сорбентов по отношению к патогенной и условно патогенной микрофлоре путем их модификации ПВП. Полимермодифицированный образец обладает антибактериальными свойствами пролонгированного действия по отношению к широкому спектру микроорганизмов (*E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa* и *St. aureus*) и к смеси их культур. Дальнейшая разработка и применение углеродных сорбентов как средств сорбционной терапии является перспективным подходом к местному лечению гнойных ран в хирургии, акушерстве и гинекологии, травматологии.

References

1. Glauser M.P., Pizzo P.A. Management of infections in immunocompromised patients. *WB Saunders*. 2000: 473.
2. Schwarz V.Ya. Infection as a obesity pathogenesis factor. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(2): 94-100. (in Russian)
3. Gordienko A.I., Beloglazov V.A., Kubyshev A.V. Changes of humoral anti-endotoxin immunity and low-intensity inflammation in diabetes mellitus type 1 and 2. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(3): 61-7. (in Russian)
4. Belik E.V., Brykalov A.V., Bostanova F.A., Gryadskikh D.A., Golovkina E.M. Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption. *Fibre Chemistry*. 2008; 40(5): 445-6.
5. Levashov P.A., Afanasieva O.I., Dmitrieva O.A., Klesareva E.V., Adamova I.Yu., Afanasieva M.I. et al. Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis. *Biochemistry*. 2010; 4(3): 303-7.
6. Baklanova O.N., Pyanova L.G., Talsi V.P., Knyazheva O.F. The surface modification of carbon sorbent poly-N-vinylpyrrolidone for the application of medicine. *Physical chemistry of surface and interface science*. 2013; 49(4): 408-17. (in Russian)
7. Pyanova L.G., Baklanova O.N., Likholobov V.A., Drozdov V.A. Research of the effect of surface modification of carbon sorbents poly-N-vinylpyrrolidone complex physical-chemical and microbiological methods. *Physical chemistry of surface and interface science*. 2012; 48(4): 363-9. (in Russian)

8. Dolgikh V.T., Pyanova L.G., Barinov S.V., Likhobov V.A., Dolgikh T.I., Ryabchikova E.I. et al. Efficacy of the molded carbon sorbent VNHTU-1 used in obstetric practice. *Obshchaya reanimatologiya*. 2015; 11(4); 61-72. (in Russian)

Сведения об авторах:

Пьянова Лидия Георгиевна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru

Долгих Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, проф., руководитель ЦНИЛ ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: prof_dolgih@mail.ru;

Лихолобов Владимир Александрович, доктор хим. наук, проф., член-корреспондент РАН, науч. руководитель ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru;

Корпачева Ольга Валентиновна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: olgkor@mail.ru;

Седанова Анна Викторовна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ФАНО «Институт проблем переработки углеводов СО РАН», e-mail: medugli@mail.ru;

Золотов Александр Николаевич, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: azolotov@mail.ru

Таран Наталья Ивановна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБУ ВО «Омский государственный медицинский университет», e-mail: aspirantura@omsk-osma.ru