

Зависимость микробицидной активности йодофорных препаратов от состава питательной среды

Г.Г. Оганесян, А.В. Топчян

Кафедра технологии лекарств и организации экономики фармации ЕРГМУ им. М.Герацци

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: антисептик, йодофор, антиоксидант, бактерии, вирусы

Среди современных антисептиков лидирующее место по-прежнему занимают препараты йода. В настоящее время предпочтение отдается использованию в качестве антисептиков йодофорам, в которых йод иммобилизован на полимерах [13,14]. Такая композиция позволяет устранить побочные эффекты йода и нивелировать кумулятивный эффект, повысить стабильность препарата при его длительном хранении, сохранив при этом его антимикробные свойства. Известные йодополимеры – йодиол (ЙОЛ), повидон-йод (ПЙ), декстрин-йод (ДЙ) и другие, обладают широким спектром микробицидного, вирулицидного и фунгицидного действия [7]. Бактерицидная активность йода (элементарный йод, гипойодная кислота, катион йода) обусловлена его способностью окислять SH-, OH- и NH₂-группы аминокислот и нуклеотидов бактериальных белков и нуклеиновых кислот [1,3–5]. Активность йодополимеров определяется не только количеством включенного йода, но и составом, структурой и молекулярной массой полимера-носителя. Существует также связь биологической активности галогидных соединений с их цветностью. Образование комплексов йода со многими высокополимерами сопровождается появлением характерной синей окраски, исчезновение которой ассоциируется с потерей их антисептических свойств [3–5,10,11].

Существует проблема точного определения микробицидной и вирулицидной активности антисептических препаратов. Результаты, полученные в различных лабораториях, сильно отличаются друг от друга и трудно воспроизводимы [7,8]. Одной из причин вариабельности результатов может рассматриваться ранее обнаруженная нами сильная зависимость активности йодофоров от состава питательной среды [10].

Цель настоящей работы – выявить и идентифицировать компоненты среды, ответственные за вариабельность получаемых результатов, на основе детального изучения бактерицидной и вирулицидной активности йодофоров в различных средах.

Материал и методы

Бактерицидное действие йодофоров было изучено согласно принятой методике 2-кратных разведений [6]. Клеточная суспензия культуры *E. coli* K-12 (λ), находящаяся в логарифмической фазе роста, разводилась в М9 до конечного титра 10^6 кл/мл, по 0,1 мл добавлялась к 0,9 мл питательной среды, содержащей йодофоры, и ставилась на инкубацию при 37°C. Рост культур определялся по появлению мутности.

Для определения вирулицидной активности йодофорных препаратов были использованы бактериофаги, которые принято считать «индикаторными видами» при скрининге антисептиков и дезинфектантов [9, 12]. Готовились 2-кратные разведения препаратов в минимальной и полноценной средах, к ним добавлялись аликвоты вирусов титром $\sim 10^6$ бляшка-образующих единиц (БОЕ) и инкубировались при 37°C в течение 40 мин. После серийных разведений производились высевы методом агаровых слоев. Титр активных вирусов определялся подсчетом стерильных пятен на бактериальном газоне.

Для изучения влияния белковой нагрузки на вирулицидное действие йодофоров были использованы различные разведения бычьей сыворотки в физрастворе, куда добавлялись сначала бактериофаги MS2 или fd103 затем йодофоры во избежание быстрой инактивации последних белками сыворотки. После 40-минутной экспозиции фаговые частицы высевались методом агаровых слоев.

В работе были использованы культура *Escherichia coli* K-12 (λ), бактериофаги – MS2- содержащий РНК и fd103-содержащий однонитчатую ДНК, полученные из музея ВКМП г. Москвы. В качестве питательных сред – полноценный бульон (ПБ) фирмы Серва; полноценный агар-триптоз (АТ) фирмы Ферак; мягкий агар (ПБ+0,6% агар); минимальная среда М9 [2]; среда М9 П (М9+пептон 0,5%); телячья сыворотка (Серва); физиологический раствор NaCl 0,9%; пептонная вода [2]. Использовались следующие йодофоры: ДЙ (декстрины м.в. 60-80кДа 100г, йод 8г, калий йодид 12г,

дис. вода до 1 л), калий йодид йодин – КЙЙ (калий йодид 12г, йод 8г, дис. вода до 1 л) производства ЗАО "Арменикум", Армения, ПЙ (поливинилпирролидон 90г, йод 10г, калий йодид 15г, дистиллированная вода до 1 л) производства Puyna Pharmaceuticals NV Belgium, ЙОЛ (спирт поливиниловый 9г, йод 1г, калий йодид 3г, дис. вода до 1 л) производства ОАО "Татхимфармпрепараты", Россия.

Результаты и обсуждение

Методом двукратных разведений йодофоров в различных питательных средах были определены их минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в отношении клеток *E. coli* K-12 (λ), конечный титр которых составлял $\sim 10^5$ на 1мл. Продолжительность инкубации культур зависела от состава питательной среды (табл.1).

Таблица 1

Определение МИК йодофоров в отношении *E. coli* K-12 (λ) в различных питательных средах

Йодофоры	Питательная среда	Кратность разведения йодофоров									
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
ДЙ	ПБ										
	М9 П										
	М9										
ПЙ	ПБ										
	М9 П										
	М9										
ЙОЛ	ПБ										
	М9 П										
	М9										
КЙЙ	ПБ										
	М9 П										
	М9										

Примечание. Подавление роста бактерий: ☐ – полное, ☐ – слабое, ☐ – отсутствие

Как видно из табл. 1, антибактериальная активность йодофорных препаратов наиболее ярко проявляется в синтетической среде. Она примерно в 40 раз выше по сравнению с таковой на полноценных средах. Активность йода, включенного в структуру полимеров, примерно в 8 раз выше по сравнению с его водным раствором. В пересчете на эквивалентное количество иммобилизованного йода, комплекс с ПВС в 3–4 раза активнее комплексов йода с остальными полимерами. Включенный в структуру высокополимеров молекулярный йод обладает пролонгиро-

ванным действием и в момент высвобождения способен принимать все формы йода: элементарный йод (I_2), гипойодная кислота (НОИ), катион йода (H_2OI), трийодид ион (I_3^-), гипойодид ион (OI^-), йодат ион (IO_3^-) [3–5].

Была изучена зависимость вирулицидной активности декстрин-йода от состава инкубационной среды. Результаты опытов по определению кинетики инактивации бактериофагов MS2 и fd103 после 40- минутной обработки разведениями йодофора в минимальной и полноценной средах приведены в табл. 2.

Таблица 2

Инактивация вирусов E. coli декстрин-йодом в полноценной и минимальной средах

Кратность разведения ДЙ	Инактивация вирусов в ПБ, %		Инактивация вирусов в М9, %	
	MS2	fd103	MS2	fd103
25	100	100	100	100
50	100	100	100	100
100	63	52	100	100
200	22	15	100	100
400	2	1	100	100
800	0	0	100	100
1600	0	0	100	100
3200	0	0	98	72
6400	0	0	35	28
12800	0	0	1	0

Как видно из табл. 2, ДЙ в М9 утрачивает способность инактивировать бактериальные вирусы при разведении в 12800 раз, тогда как в ПБ она наступает уже при разведении в 320 раз. Сравнения данных табл. 1 и 2 указывают на то, что вирулицидная активность ДЙ от 10 до 40 раз выше его антибактериальной активности. Такая разница в активности, по-видимому, связана с тем, что по сравнению с вирусами бактериальные клетки более богаты белками, липидами и другими соединениями, чувствительными к действию йода.

Таблица 3

Влияние белковой нагрузки на вирулицидную активность декстрин-йода

Концентрация сыворотки, %	Титр MS2	Доля активных вирусов
Начальный титр вируса	$7,8 \times 10^5$	1
50	$2,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^{-1}$
25	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-1}$
12,5	$2,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^{-2}$
6,25	$4,6 \times 10^2$	$5,9 \times 10^{-4}$
3,125	52	$6,5 \times 10^{-5}$
1,562	0	$< 7,8 \times 10^{-6}$
0	0	$< 7,8 \times 10^{-6}$

Для изучения зависимости вирулицидного действия ДЙ (1:20) от белковой нагрузки были использованы разведения бычьей сыворотки в физрастворе (табл. 3).

Как видно из табл. 3, вирулицидная активность ДЙ повышается в зависимости от снижения белковой нагрузки. Так, при выдержке в 50% бычьей сыворотке титр инфекционного вируса падает в 3 раза, тогда как при 6,25% – на 3 логарифма. При дальнейшем снижении белковой нагрузки до 2% и ниже отмечается полная инактивация всей популяции вируса.

Таблица 4

Влияние аминокислот на микробицидную активность и цветность ДЙ

Аминокислота	Кратность разведения ДЙ+ аминокислота					
	1	2	4	8	16	32
Серин ●						
Лизин ●						
Аспарагин ●						
Асп. к-та ●						
Орнитин ●						
Триптофан ○						
Треонин ●						
Гистидин ●						
Аланин ●						
Метионин ○						
Лейцин ●						
Изолейцин ○						
Фенилаланин ●						
Пролин ●						
Глутамин ●						
Глут. к-та ●						
Цистеин ○						
Тирозин ○						
Валин ●						
Альбумин ○						
ДЙ ●						

Примечание: ● – синяя окраска, ○ – потеря окраски, остальные обозначения те же, что в табл. 1

Для установления влияния роли отдельных составляющих полноценной питательной среды в процессе инактивации йодофоров были приготовлены смеси отдельных аминокислот, нуклеотидов и витаминов с ДЙ и изучена их микробицидная активность в минимальной среде М9. Исходные смеси, состоящие из декстрина-йода 1%, аминокислоты 500мкг/мл или альбумина 7мг/мл, готовились не менее чем за 1ч до инокуляции бактериями с целью обеспечения возможной реакции испытуемых соединений с йодофором. Индикатором прохождения реакции служило исчезновение синей окраски ДЙ. Данные по определению минимальных ингибирующих концентраций в отношении *E. coli* K-12 и цветности приготовленных смесей приведены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, триптофан, метионин, гистидин, изолейцин, цистеин и тирозин полностью инактивируют ДЙ. Влияние остальных аминокислот на активность ДЙ или слабо или почти не выражено. Вызванная альбумином инактивация и обесцвечивание ДЙ указывает на то, что наличие пептидных связей не влияет на антагонистические свойства вышеуказанных аминокислот, находящихся в его составе.

Все аминокислоты, приводящие к инактивации ДЙ, одновременно вызвали его обесцвечивание. Наблюдаемая антимикробная активность прозрачной ДЙ+цис смеси коррелируется с активностью самого цистеина [10]. Повышенная активность синей смеси ДЙ с аланином обусловлена антимикробным действием и ДЙ и аланина, по отношению к которому штамм *E. coli* K-12(λ) обладает высокой чувствительностью [2].

Было изучено также влияние нуклеотидов на активность ДЙ в концентрации 50мкг/мл (табл. 5).

Таблица 5

Влияние нуклеотидов на микробицидную активность и цветность ДЙ

Нуклеотид		Кратность разведения смесей с ДЙ+ нуклеотид				
		1	2	4	8	16
Аденин	●					
Гуанин	●					
Цитозин	●					
Тимин	●					
Урацил	○					
ДЙ	●					

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 4

Как видно из табл. 5, из пяти проверенных нуклеотидов только урацил проявляет сильно выраженный антагонизм к ДЙ, вызывая одновременно обесцвечивание и потерю биологической активности препарата.

Аналогичным образом изучалось влияние ряда витаминов на активность препарата ДЙ. Исходные смеси содержали ДЙ в разведении 1:100 и витамины в концентрациях 500 мг/мл (табл. 6).

Как видно из табл. 6, витамины А, В₁, С и D₃ инактивируют препарат ДЙ, тогда как никотиновая кислота, холин, пантотенат кальция и фолиевая кислота заметного влияния не оказывают.

Таблица 6

Влияние витаминов на микробицидную активность и цветность ДЙ

Витамин		Кратность разведения ДЙ+ витамин				
		1	2	4	8	16
Никотиновая к-та	●					
Витамин В ₁	○					
Холин	●					
Пантотенат кальция	●					
Витамин С	○					
Фолиевая к-та	●					
Витамин D ₃	○					
Витамин А	○					
ДЙ	●					

Примечание. Обозначения те же, что в табл. 4

При сопоставлении данных табл. 4–6 обнаруживается, что все соединения, проявляющие антагонизм к йодофорам, являются антиоксидантами. В водных растворах йода с крахмалом, поливинилловым спиртом, поливинилпирролидоном биологически активной формой является йод со степенью окисления +1 [3–5]. Именно окислительным механизмом антимикробного действия йодофоров обусловлена их чувствительность к антиоксидантам.

Таким образом, на основании полученных результатов было установлено, что выраженная зависимость биологической активности йодофорных препаратов от состава питательной среды обусловлена наличием аминокислот, нуклеотидов, витаминов и других соединений, обладающих антиоксидантной активностью, которые вступая в реакцию с йодофорами инактивируют их. В связи с этим для обеспечения воспроизводимости результатов оценки микробицидной или вирулицидной активности йодофоров крайне важно учитывать наличие в среде антиоксидантов.

Поступила 15.06.06.

Յոդոֆորային պարասպորտների մանրէասպան ակտիվության կախվածությունը սննդամիջավայրի կազմից

Ն.Գ. Նովիհանյան, Ն.Վ. Թոփչյան

Հայտնաբերվել է յոդոֆորների՝ դեքստրին-յոդի, պովիդոն-յոդի և յոդինոլի մանրէասպան ակտիվության կախվածությունը սննդամիջավայրի կազմից: Միմյան սննդամիջավայրում պարասպորտների ազդեցությունը մի քանի կարգով ավելի բարձր է քան լիարժեք սննդամիջավայրերում: Հաստատվել է, որ յոդոֆորների անկայունությունը պայմանավորված է լիարժեք սննդամիջավայրերում պարունակվող հալաօքսիդանտների՝ ամինաթթուների, վիտամինների,

նուկլեոտիդների նկատմամբ նրանց ունեցած զգայունությամբ: Յոդոֆորների ակտիվությունը ընկնում է մեկ հալաօքսիդանտ պարունակող բարձրմոլեկուլային միացությունների՝ սպիտակուցների, նուկլեինաթթուների ազդեցության տակ:

Այսպես, ցլի շիճուկի սպիտակուցային բեռնվածության միջոցով ֆիզիոլոգիական լուծույթում մոտավորապես միջոցով բերում է յոդոֆորային պարասպորտների մանրէասպան ակտիվության ուժեղացման:

The dependence of microbicidal activity of iodophore preparations on the nutrient medium composition

H.G. Hovhannisyan, H.V. Topchyan

High variability of microbicidal activity of iodophores (dextrin-iodine, povidone-iodine and iodinol) depending on the composition of nutrient media has been revealed. The activity of the preparations is for several folds higher in the minimal medium than in rich medium. It has been established that the reason of iodophores low activity is the high susceptibility to antioxidants: amino acids, vita-

mins and nucleotides contained in rich medium. The activity of iodopolymers is reduced also under action of antioxidant-containing high-molecular compounds, such as proteins, nucleic acids, etc. Thus, lowering of calf serum protein load by dilution in 0.9% sodium chloride solution brings to enhancing of preparations microbicidal activity.

Литература

1. Блатун Л.А. Повидон-йод как средство профилактики и лечения инфекционных осложнений. Инфекции и антимикробная терапия, 2005, 7(2), с.37-44.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976, 436с.
3. Махнач В.О. Соединения йода с высокополимерами, их антимикробные и лечебные свойства, Л., АН СССР, 1962, 178с.
4. Махнач В.О. Теоретические основы биологического действия галоидных соединений, Л., 1968, 298с.
5. Махнач В.О. Йод и проблемы жизни, Л., 1974, 254с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, М., 2000, с 264-269.
7. Bloomfield S.F., Looney E. Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity disinfectants and antiseptics, J. Appl. Bacteriol., 1992, 73(1), p.87-93.
8. Papageorgiou G.T., Mocè-Llivina L., Juan J. New method for evaluation of virucidal activity of antiseptics and disinfectants, Appl. Environ. Microbiology, 2001, 67(12), p.5844-5848.
9. Gottardi W. Iodine and iodine compounds. In: S.S. Block (ed), Disinfection, Sterilization and Preservation. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983, p.183-196.
10. Hovhannisyan H.G. Microbicidal and virucidal action of antioxidants and their interaction with iodophores. 13th International Symposium on HIV & Emerging Infectious Diseases, Toulon, France, June 3-5, 2004, p.183.
11. Lyoo W.S., Yeum J.H., Ghim H.D., Park J.M., Lee S.J., Kim J.H., Shin D.Y. and Lee J.W. Effect of the molecular weight of poly(vinyl alcohol) on the water stability of a syndiotactic poly(vinyl alcohol)/iodine complex film. Colloid Polymers: a comparative study of candidate microbicides, BMC Infect. Dis., 2003, 2, p.1-11.
12. McDonnell G. and Russell A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance, Clinical Microbiology Reviews, 1999 Jan. 12, 1, p 147-179.
13. Nimz O., Gebler K., Laetting S., Welfle H., Sheldrick G.M. and Saenger W. X-ray structure of the cycloamylose triiodide inclusion complex provides a model for amylose-iodine at atomic resolution, Carbohydr. Res., 2003, 338, p.977-986.
14. Noltemeyer M. and Saenger W. X-ray studies of linear poliodide chain in α -cyclodextrin channels and a model for the starch-iodine complex, Nature, 1976, 259, p.629-632.