

УДК 57.083.2+578.74

**АНТИМІКРОБНІ ТА ПРОТИГРИБКОВІ ВЛАСТИВОСТІ СУКЦИНИЛЬОВАНОГО
β-ЦИКЛОДЕКСТРИНУ І ЙОГО КОМПЛЕКСУ ВКЛЮЧЕННЯ З НІСТАТИНОМ****Мартинов А.В., Клемчук Л.В., Осолодченко Т.П., Батрак О.О., Петрова Т.М., Штикер Л.Г.,
Завада Н.П., Лісняк Ю.В.****Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, м. Харків****ВСТУП**

Вже понад 30 років циклодекстрини використовуються в фармацевтичному виробництві як допоміжні речовини для солюбілізації малорозчинних у воді ліків. Наприклад, в останні роки ряд дослідників звернули увагу на той факт, що обробка культур клітин ністатином чи циклодекстрином, перед зараженням цих клітин одним з вірусів: вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусом Епштейна-Барр, Ебола чи вірусом простого герпесу-1 (ВПГ-1), призводить до блокади адгезії на клітинах вірусів та відповідно нездатності останніх інфікувати культуру [1,2]. Цей ефект дослідники пов'язують із здатністю ністатину та циклодекстрину утворювати комплекси включення з холестеринем з клітинних мембран [2]. Втрата клітинною мембраною холестерину призводить завдяки невідомому на цей час механізму до втрати клітиною здатності до інфікування вірусами (не тільки ВІЧ) [3].

Використання ністатину на практиці є малоефективним із-за ряду побічних ефектів і недоліків ністатину: низькій розчинності та відносно високій токсичності. Для іншого полієнового антибіотика – амфотеріцину вже були отримані високоефективні та малотоксичні комплекси включення з циклодекстрином [4], але противірусна активність при цьому не вивчалася. Ефективна ж доза циклодекстрину перевищує 300 мг/кг ваги, що є недоцільним із-за відносно високій ціні на цей препарат.

Хоч β-циклодекстрин вже довгий час використовується як солюбілізатор багатьох малорозчинних препаратів, в т.ч. гормонів [5] та як сильний дезінтоксикант, до цього часу, як інгібітор адгезії вірусів, він не впроваджений. Його високі дози при пероральному використанні призводять до значного падіння концентрації холестерину у гіпохолестеринемічних щурів при відсутності побічної дії [6]. Якщо вдасться отримати комплекс включення між ністатином і циклодекстрином, можна значно зменшити ефективну дозу циклодекстрину та токсичність ністатину, збільшити розчинність останнього та потенціювати противірусні ефекти обох препаратів. Окрім того, ністатин являє собою поліспирт, гідроксильні спиртові групи якого також можна модифікувати ацилюванням, як до включення до комплексу, так і після цього. Відповідно похідні з різноманітними ступенями ацилювання можуть бути отримані та досліджені на предмет проявлення противірусної активності.

Метою дослідження було отримати ряд ацильованих похідних β-циклодекстрину (ацильованих малеїновим та бурштиновим ангідридами), отримати комплекси включення між цими похідними та ністатином, підтвердити структури отриманих речовин та дослідити їх протимікробні і протигрибкові властивості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

β-циклодекстрин для синтезу та суміш α- та β-циклодекстринів (ЧДА Fluka) як маркерів молекулярних мас для електрофорезу була люб'язно надана для досліджень науковим директором російського представництва фармацевтичної компанії ICN-pharmaceuticals (м. Курск) професором Покровським М.В. Синтез повністю сукцинільованого циклодекстрину (С-ЦД) проводили за такою методикою:

10^{-3} моль (1,135 г) β-циклодекстрину (ЦД) розчиняли у 40 мл гарячої дистильованої води, додавали $21 \cdot 10^{-3}$ моль (2,100 г) бурштинового ангідриду, розчин перемішували до повного розчинення ангідриду.

При охолодженні до $+5^{\circ}\text{C}$ випадав осад С-ЦД (неацильований циклодекстрин не випадає з розчину при охолодженні). С-ЦД перекристалізували аналогічним чином з дистильованої води. Структуру отриманого С-ЦД встановлювали за кількістю розрахованих карбоксильних груп у структурі з використанням аніонообмінної хроматографії на аніоніті АВ-2 за методикою [7]. Молекулярну масу С-ЦД встановлювали з використанням методу електрофорезу в поліакриламідному гелі з доданням 0,001% етидію броміду (з С-ЦД та ЦД утворює флюоресцюючі комплекси включення). Як електролітичний буфер використовували боратний буфер, що містив 0,05 М тринатрію тетраборату (рН 9,2), борат – іон взаємодіє із цис-гідроксильними групами у мономерних одиницях полісахариду та надає їм заряд [8]; електрофорез проводили при напрузі 500 В та силі току 30 мА [9]. Смуги фіксували на флюороскопі. Як контроль використовували неацильований β -циклодекстрин та α -циклодекстрин. Молекулярну масу С-ЦД встановлювали за калібрувальним графіком.

Комплекс включення між ністатином та С-ЦД утворювали з використанням ультразвуку (44 кГц) на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-2Т. До флакону з 20 мл водного розчину 10^{-3} моль (3,222 г) С-ЦД додавали 10^{-3} моль (0,956 г) ністатину у вигляді подрібненого порошку. Обробляли суміш ультразвуком по 3 рази 2 хвилини при 44 кГц. Аналогічно пробували утворити комплекс між ЦД та ністатином.

Протимікробні та протигрибкові властивості речовин вивчали відповідно до діючих нормативних документів [10,11,12]:

В досліді брали стандартні штами мікроорганізмів, які регламентовані ВООЗ для вивчення антибактеріальної дії препаратів:

Staphylococcus aureus 25923 ATCC, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC, *Candida albicans* 885-653 ATCC, *Aspergillus niger* 156-783 ATCC.

Крім того, були досліджені й клінічні штами цих видів мікроорганізмів, які були виділені від хворих з інфекційними захворюваннями різного генезу.

Для визначення антибактеріальної дії дослідної речовини культури мікроорганізмів вирощували на м'ясо-пептонному агарі при 37°C , а гриби на агарі Сабуро при кімнатній температурі. Термін культивування для мікроорганізмів складав 24 години, для грибів 48-72 години.

Протимікробну дію препарату проводили за методом дифузії в агар. Для цього в чашку Петри заливали 10 мл розплавленого поживного агару, на який після застигання ставили циліндри із нержавіючої сталі. Навколо циліндрів заливали другий шар агару з мікробною сумішшю відповідного мікробного навантаження. Для стафілококів воно складало 10^7 КУО/мл (колонієутворюючих одиниць на мл бульйонного середовища або фізіологічного розчину), для інших мікроорганізмів – 10^8 КУО/мл. Після застигання верхнього шару циліндри виймали і в лунки закладали препарати 1,0 %-ного розчину. Заліки результатів проводили через 24 години, а для грибів через 48-72 години.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Були синтезовані та досліджені С-ЦД та його комплекс включення з ністатином. Характеристики синтезованих похідних представлені у таблиці 1.

Таблиця 1. Характеристики синтезованих похідних β -циклодекстрину

Речовина	Кількість ангидриду, моль (г).	Молекулярна маса отриманої речовини, Да		Заряд молекули отриманої речовини	
		Розраховано	Встановлено	Розраховано	Встановлено*
1	2	3	4	5	6
С-ЦД	$2,1 \cdot 10^{-4}$	3235 ± 5	3220 ± 25	21 ± 2	20 ± 4

1	2	3	4	5	6
	(0,210)				
ЦД	-	1135±5	1120±10	-	-
ЦД + ністатин	**	**	**	**	**
С-ЦД + ністатин	2,1*10 ⁻⁴ (0,210)	4191±5	4410±25	21±2	17±4

* В молекулі циклодекстрина 21 вільних гідроксила, здатні ацилюватися.

** Комплекс не утворюється (ністатин залишається невключеним)

Як видно з таблиці 1, розраховані та встановлені маси комплексу включення не співпадають. Причиною цього може бути більш жорсткіша структура комплексу включення та зменшення рухомості такого комплексу у гелі. Відповідно, спостерігається збільшення маси комплексу та зникнення лінійної залежності між рухомістю та масою (завдяки жорсткій структурі молекули). При цьому заряд комплексу фактично не змінюється. Щодо С-ЦД, то його маса та заряд молекули фактично співпадають з розрахованими величинами, що свідчить про завершення реакції сукцинілювання. Розчинність у воді ністатину при його диспергуванні з С-ЦД збільшується у 12 разів (від 0,1% до 1,2%), хоч і спостерігається опалесценція розчину та збільшується його густина. Відсутність зон затримки росту навколо лунки вказувало на те, що мікроорганізм не чутливий до дії внесеного препарату. Діаметри зони затримки росту (11-15 мм) вказували на слабку дію речовини. 15-25 мм розцінювали, як показник чутливості штамів бактерій до дослідного препарату, а діаметри зон затримки росту вище 25 мм свідчили про високі антибактеріальні якості лікарського засобу.

В результаті отриманих даних було встановлено, що сукцинільований β-декстрин та його комплекс з ністатином має протимікробну та антифунгальну дію по відношенню до стандартних та клінічних штамів бактерій. Данні наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. Діаметри зон затримки росту препаратів по відношенню до різних груп мікроорганізмів.

Мікроорганізми	Діаметри зон затримки росту, мм		
	Сукциніл. циклодекстрин	Ністатин	Комплекс з ністатином
S.aureus 25923	23,2±0,4	Ріст	17,3±0,2
E.coli 25922	15,1±0,2	Ріст	13,5±0,1
P.aeruginosa 27853	Ріст	Ріст	12,3±0,3
C.albicans 885-653	13,4±0,2	21,2±0,2	23,2±0,2
A.niger 156-783	14,2±0,2	20,2±0,2	25,3±0,2
S.aureus клінічний	16,2±0,3	Ріст	13,1±0,2
E.coli клінічний	Ріст	ріст	Ріст
P.aeruginosa клінічний	Ріст	ріст	Ріст
C.albicans клінічний	12,5±0,2	21,4±0,2	23,1±0,2
A.niger клінічний	14,2±0,2	22,7±0,2	26,2±0,2

Як видно із наведених даних, сукцинільований циклодекстрин має протимікробну активність по відношенню до стафілококу, слабка дія має місце по відношенню до грибів. На паличку синьо-зеленого гною та клінічну кишкову паличку речовина не діяла. Напроти, цей комплекс з ністатином мав високі антифунгальні властивості. Зони затримки росту складали 23-26 мм, тоді, як при вивченні чистого сукциніл-

циклодекстрину вони дорівнювали 13-14 мм. По відношенню до мікроорганізмів комплекс з ністатином мав слабку або виражену антибактеріальну дію. Відмічено, що ця речовина незначно затримувала ріст палички синьо-зеленого гною, але клінічні штами грамнегативних мікроорганізмів були резистентні.

Слід відмітити, що сукцинільований β-декстрин в комплексі з ністатином володіє більш високими антифунгальними властивостями у порівнянні з окремими препаратами, зокрема, з аптечним ністатином.

ВИСНОВКИ

1. Між ЦД та ністатином не вдалося отримати стабільного комплексу включення.
2. Між С-ЦД та ністатином було отримано комплекс включення, маса якого відрізняється від розрахованої, можливо, завдяки більш жорсткій структурі.
3. С-ЦД, на відзнаку від ЦД, має значні протимікробні властивості по відношенню до *S.aureus*.
4. С-ЦД має помірні протимікробні властивості проти *P.aeruginosa* та протигрибкові властивості по відношенню до грибів *C.albicans* *A.niger*.
5. Клатратний комплекс між С-ЦД та ністатином має на 15-30% більшу протигрибкову активність ніж окремі компоненти комплексу

Список літератури

1. Katzman RB, Longnecker R. Cholesterol-dependent infection of Burkitt's lymphoma cell lines by Epstein-Barr virus// *J Gen Virol.* - 2003. N.84 (11).-P.2987-2992
2. Bender FC, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry// *J Virol.* -2003 Sep.-Vol.77.-N17.-P 9542-9552.
3. Graham DR, Chertova E, Hilburn JM, Arthur LO, Hildreth JE. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts// *J Virol.* - 2003 Aug.-Vol.77.-N15.- P. 8237-8248.
4. Chakraborty KK, Naik SR. Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin - beta complexed with different chemically modified beta – cyclodextrins// *J Pharm Pharm Sci.* - 2003 May-Aug.-Vol.6.-N2.-P231-237.
5. Loftsson T, Gudmundsson JA, Arnadottir RO, Fridriksdottir H. Sublingual delivery of 17beta-estradiol from cyclodextrin containing tablet// *Pharmazie.* -2003 May.- Vol.58.-N5.-P.358-359.
6. Garcia-Mediavilla V, Villares C, Culebras JM, Bayon JE, Gonzalez-Gallego J. Effects of dietary beta-cyclodextrin in hypercholesterolaemic rats// *Pharmacol Toxicol.* -2003 Feb.-Vol.92.-N2.-P 94-99.
7. Kuipers M.E., vd Berg M., Swart P.J., et al. Mechanism of anti-HIV activity of succinylated human serum albumin// *Biochem. Pharmacol.*-1999.-Vol. 15.-N.57(8).-P.889-898
8. Jiang S.M., Xiao Z.M., Xu Z.H. Inhibitory activity of polysaccharide extracts from three kinds of edible fungi on proliferation of human hepatoma SMMC-7721 cell and mouse implanted S180 tumor// *World J. Gastroenterol.* - 1999.- Vol.5.- N 5.-P. 404-407
9. Pae H.O., Seo W.G., Kim N.Y., et al. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer// *Leuk. Res.* - 2001.-Vol.25.- N 4.-P.339-346
10. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран./ Доценко Б.М., Бирюкова С.В. и др.- Москва, 1989 г.-45 с.

11. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций./ Волянский Ю.Л., Калиниченко М.Ф. и др.- Харьков, 1991 г.
12. Державна Фармакопея . Україна, -Київ,2001 .-2000 с.

УДК 57.083.2+578.74

АНТИМІКРОБНІ ТА ПРОТИГРИБКОВІ ВЛАСТИВОСТІ СУКЦИНИЛЬОВАНОГО β -ЦИКЛОДЕКСТРИНУ І ЙОГО КОМПЛЕКСУ ВКЛЮЧЕННЯ З НІСТАТИНОМ

Мартинів А.В., Клемчук Л.В., Осолодченко Т.П., Батрак О.А., Петрова Т.М., Штыкер Л.Г., Завада Н.П., Лісняк Ю.В.

Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України

В статті представлені результати дослідження протимікробних і протигрибкових властивостей сукцинильованого циклодекстрину та його клатратних комплексів з ністатином. Показано, що ністатин з β -циклодекстрином не утворює комплексів включення, тоді як сукцинильований β -циклодекстрин з ністатином утворює опалесцюючий комплекс. Маса синтезованого комплексу включення, встановлена методом гель-електрофорезу значно відрізняється від розрахованого. Це може бути пов'язано з більш жорсткішою структурою комплексу включення та зменшенням рухомості в гелі. Показано, що сукциніл-циклодекстрин має помірні протимікробні властивості по відношенню до *P.aeruginosa*, грибів *S.albicans* *A.niger*, сильні протимікробні властивості щодо *S.aureus*. Тоді як згідно літературних джерел неацильований β -циклодекстрин не має ні протимікробних, ні протигрибкових властивостей. Клатратні комплекси між сукциніл- β -циклодекстрином та ністатином були активнішими (на 15-30%), ніж окремо ністатин та β -циклодекстрин.

Ключові слова: β -циклодекстрин, сукцинильований β -циклодекстрин, ністатин, комплекс включення, протимікробні та протигрибкові властивості.

УДК 57.083.2+578.74

АНТИМІКРОБНЫЕ И ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ СВОЙСТВА СУКЦИНИЛИРОВАННОГО β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА И ЕГО КОМПЛЕКСА ВКЛЮЧЕНИЯ С НИСТАТИНОМ

Мартынов А.В., Клемчук Л.В., Осолодченко Т.П., Батрак Е.А., Петрова Т.М., Штыкер Л.Г., Завада Н.П., Лисняк Ю.В.

Институт микробиологии и иммунологии им.И.И.Мечникова АМН Украины

В статье представлены результаты исследования противомикробных и противогрибковых свойств сукцинилированного β -циклодекстрина и его клатратных комплексов с нистатином. Показано, что нистатин с β -циклодекстрином не образует комплексов включения, тогда как сукцинилированный β -циклодекстрин с нистатином образует опалесцирующий комплекс. Масса синтезированного комплекса включения, установленная методом гель-электрофореза, значительно отличается от рассчитанной. Это может быть связано с более жесткой структурой комплекса включения и, соответственно, уменьшением его подвижности в геле. Показано, что сукциніл-циклодекстрин имеет выраженные противомикробные свойства в отношении *P.aeruginosa*, грибов *S.albicans* *A.niger*, сильные противомикробные свойства относительно *S.aureus*. Тогда как, согласно литературным источникам, неацилированный β -циклодекстрин не имеет ни противомикробных, ни противогрибковых свойств. Клатратные комплексы между сукциніл- β -циклодекстрином и нистатином были более активными (на 15-30%), чем в отдельности нистатин и β -циклодекстрин.

Ключевые слова: β -циклодекстрин, сукцинилированный β -циклодекстрин, нистатин, комплекс включения, противомикробные и противогрибковые свойства.

UDC 57.083.2+578.74

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL PROPERTIES OF SUCCINYLATED β -CYCLODEXTRIN AND ITS INCLUSION COMPLEX WITH NYSTATIN

**Martynov A.V., Klemchuk L.V., Osolodchenko T.P., Batrak E.A.,
Petrova T.M., Shtyker L.G., Zavada N.P., Lisnyak Yu.V.**

I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine

In the paper, results of studies on antimicrobial and antifungal properties of succinylated β -cyclodextrin and its inclusion complex with nystatin are presented. It is shown that β -cyclodextrin does not form inclusion complex with nystatin whereas succinylated β -cyclodextrin forms opalescent inclusion complex with nystatin. Mass of the inclusion complex determined by gel-electrophoresis differs considerably from the calculated one. It may be caused by the more rigid structure of inclusion complex and correspondingly by decrease of its mobility in the gel. It is shown that succinyl β -cyclodextrin has apparent activity against *P.aeruginosa*, *C.albicans* and *A.niger* and strong one against *S.aureus* whereas in accordance with literature non-acylated β -cyclodextrin has no antimicrobial and antifungal properties. Inclusion complexes between succinyl β -cyclodextrin and nystatin were more active (by 15%-30%) compared to nystatin and β -cyclodextrin taken separately.

Key words: β -cyclodextrin, succinyl β -cyclodextrins, nystatin, inclusion complex, antimicrobial and antifungal properties