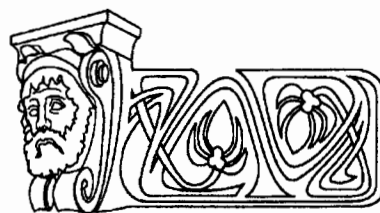




УДК 579:661.489:547.49:616.157:57.063.8]-092.2-076(045)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА



Н. Ю. Русецкая, В. Б. Бородулин, С. А. Коннова*, И. В. Бабушкина**, Г. Б. Вайнер

Саратовский государственный медицинский университет

E-mail: natfom-2006@yandex.ru

* Саратовский государственный университет

E-mail: konnova@ibppm.sgu.ru

** ФГУ «СарНИИТО Росмедтехнологий»

E-mail: sarniito-lab@yandex.ru

Изучена антибактериальная активность диацетофенилселенида (препарат 1) и его нитропроизводного (препарат 2) на десяти клинических штаммах золотистого стафилококка. Обнаружена значительно более высокая антибактериальная активность препарата 2, который в концентрации 0,01 мг/мл при различном времени воздействия вызывает гибель 10,6–69,2% бактериальных клеток по сравнению с контролем.

Ключевые слова: антибактериальная активность, селен, золотистый стафилококк, клинический штамм.

The Comparative Characteristic of Antibacterial Activity of Selenoorganic Compounds on Clinical Strains of Staphylococcus Aureus

N. Yu. Rusetskaya, V. B. Borodulin, S.A. Konnova, I. V. Babushkina, G. B. Vainer

Antibacterial activity of diacetophenonylselenide (a compound 1) and its nitroderivative (a compound 2) on ten clinical strains of Staphylococcus aureus is studied. Much higher antibacterial activity of the compound 2 which in concentration of 0,01 mg/ml at various time of influence causes destruction of 10,6–69,2% of bacterial cells in comparison with the control is found out.

Key words: antibacterial activity, selenium, staphylococcus aureus, clinical strain.

В настоящее время активно изучается биохимия и фармакология селеноорганических соединений. На протяжении последних лет установлена противоопухолевая, противовирусная, антимикробная, антиоксидантная, антитоксическая активность органических соединений селена [1–3]. Например, селеноорганический препарат эбселен обладает антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий при низкой концентрации (MIC = 0,2–1,5 мкг/мл) [4–7].

Антимикробная активность эбселена сопоставима с активностью некоторых препа-

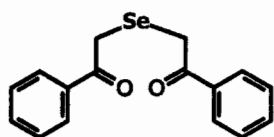
ратов нитрофуранового ряда. В течение 60 лет в медицинской практике и ветеринарии для лечения бактериальных и некоторых протозойных инфекций применяются препараты – производные 5-нитрофурана. Противомикробная активность этого класса химических соединений была впервые установлена в 1944 г. M. Dodd, W. Stillman [8]. Нитрогруппа имеет существенное значение для проявления антимикробных свойств ряда химических соединений, что хорошо демонстрируется на примере нитрофуранов, нитроимидазолов и хлорамфеникола; получены интересные данные о высокой антимикробной активности 6-нитропроизводных хинолона [9].

В отечественном животноводстве, птицеводстве и ветеринарии применяется селеноорганический препарат диацетофенилселенид (ДАФС-25), который действует как иммуностимулятор, антиоксидант и антитоксикант, приводит к увеличению яичной и мясной продукции [10].

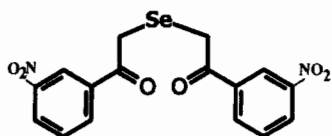
В связи с этим целью работы явилось изучение сравнительного антимикробного действия препарата диацетофенилселенид (ДАФС-25) и его нитропроизводного на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

В эксперименте использовали: препараты 1,5-дифенил-3-селенапентандион-1,5 – ДАФС-25 (препарат 1) и 1,5-ди-(м-нитрофенил)-3-селенапентандион-1,5 – нитропроизводное соединения ДАФС-25 (препарат 2) в различных концентрациях. Препараты лю-



Препарат 1



Препарат 2

безно предоставлены профессором, доктором химических наук Б.И. Древром.

Эксперимент проводили на 10-ти токсически идентичных клинических штаммах *Staphylococcus aureus*, выделенных от больных с гнойными осложнениями, находящимися на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре Саратовского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (СарНИИТО) и обладающих резистентностью к пяти и более профильным антибиотикам.

Суспензию бактерий готовили по стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича путем последовательных разведений до конечной концентрации бактерий – $3 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл. 1 мг соединения растворяли в 100 мкл ДМФА (диметилформаида), добавляли 900 мкл 0,9%-ного NaCl – проба 1 (1 мг/мл). В качестве контроля использовали 1 мл ДМФА + 9 мл 0,9%-ного NaCl. Затем из пробы 1 отбирали 100 мкл, добавляли 900 мкл из контрольной пробирки, получая пробу 2 (0,1 мг/мл). Из пробы 2 отбирали 100 мкл содержимого, добавляли 900 мкл из контроля, получая пробу 3 (0,01 мг/мл). Из пробы 3 отбирали 100 мкл раствора, добавляли 900 мкл из контроля, получая пробу 4 (0,001 мг/мл). В пробирки с разведениями препарата добавляли по 100 мкл конечной суспензии ($3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл) микроорганизмов, встряхивали и инкубировали в течение 30, 60, 90, 120, 150 мин при комнатной температуре.

В качестве контроля использовали такие же количества бактериальной взвеси, разведенные в аналогичных пропорциях с контролем (ДМФА с 0,9%-ным NaCl), и также выдержанные в течение тех же промежутков времени. После этого бактериальные взвеси

из каждой пробирки в количестве 100 мкл высевали на чашки Петри с твердой питательной средой (мясо-пептонный агар), которые затем помещали в термостат на 24 ч при 37°C. Подсчет колоний производили на следующий день.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 6.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро–Уилкса). Большинство данных не соответствуют закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовался *U*-критерий Манна–Уитни, на основании которого рассчитывался *Z*-критерий Фишера и показатель достоверности *p*. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что характер влияния препарата на рост клинических штаммов и выраженность антибактериального эффекта зависят от концентрации препарата и времени воздействия на бактериальную взвесь.

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, препарат 1 обладал незначительной антибактериальной активностью против клинических штаммов *Staphylococcus aureus*.

При 30-минутной инкубации препарата 1 с клиническими штаммами золотистого стафилококка отмечалось достоверное ($p < 0,05$), но незначительное уменьшение числа бактериальных колоний: в концентрации 0,1 мг/мл – на 26,12%, в концентрации 0,01 мг/мл – на 20,11% и в концентрации 0,001 мг/мл – на 17,705%.

При инкубации 90 мин препарат 1 подавлял рост колоний золотистого стафилококка в концентрации 1 мг/мл на 32,78%. При данной инкубации препарат 1 в концентрациях 0,1 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл не оказывал антибактериального действия. Также не обнаружено достоверной антимикробной активности препарата 1 при инкубации штаммов золотистого стафилококка в течение 60, 120 и 150 мин во всех изученных концентрациях (см. табл. 1).



Таблица 1

Антибактериальное действие препарата 1 на клинические штаммы золотистого стафилококка

Время воздействия, мин	Количество колоний на твердых питательных средах				
	Контроль (ДМФА и физ. р-р)	Опытные группы, концентрация вещества, мг/мл			
		1	0,1	0,01	0,001
30	915 (786;996)	794(685;876) $Z_k = 1.02;$ $p_k = 0.307490$	676(643;789) $Z_k = 2.72;$ $p_k = 0.006502$	731(677;867) $Z_k = 2.22;$ $p_k = 0.025749$	753(645;771) $Z_k = 2.58;$ $p_k = 0.010166$
60	842 (598;1068)	722(513;987) $Z_k = 0.60;$ $p_k = 0.545350$	761(573;890) $Z_k = 0.76;$ $p_k = 0.449622$	657(563;845) $Z_k = 1.29;$ $p_k = 0.198079$	891(714;893) $Z_k = 0.73;$ $p_k = 0.340424$
90	906 (673;974)	609(481;876) $Z_k = 1.97;$ $p_k = 0.049367$	753(723;897) $Z_k = 1.09;$ $p_k = 0.273037$	713(483;937) $Z_k = 1.36;$ $p_k = 0.173618$	786(592;945) $Z_k = 1.06;$ $p_k = 0.289919$
120	820 (618;897)	710(598;896) $Z_k = 0.72;$ $p_k = 0.472676$	595(560;967) $Z_k = 0.83;$ $p_k = 0.405680$	938(704;1056) $Z_k = 0.91;$ $p_k = 0.364347$	868(672;934) $Z_k = 0.19;$ $p_k = 0.850107$
150	824 (567;977)	718(594;934) $Z_k = 0.53;$ $p_k = 0.596702$	925(784;1267) $Z_k = 1.13;$ $p_k = 0.256840$	1026(906;1378) $Z_k = 2.23;$ $p_k = 0.025749$	991(908;1068) $Z_k = 1.97;$ $p_k = 0.049367$

Кроме того, следует отметить достоверное увеличение числа колоний золотистого стафилококка при инкубации в течение 150 мин в концентрации 0,01 мг/мл – на 24,51% и в концентрации 0,001 мг/мл – на 20,27% по сравнению с контролем ($p < 0,05$), а также при инкубации 120 мин в концентрации 0,001 мг/мл на 22,44% ($p < 0,05$). Можно предположить, что препарат 1 в малых концентрациях и при длительной инкубации положительно влияет на метаболические процессы у колоний золотистого стафилококка, стимулируя деление, рост и развитие колоний (см. табл. 1).

Препарат 2 проявлял более выраженную антимикробную активность по сравнению с препаратом 1. Препарат 2 в концентрации 0,1 мг/мл значительно подавлял рост клинических штаммов золотистого стафилококка на 53,28% (30 мин), 69,25% (60 мин), 64,69% (90 мин), 83,97% (120 мин) соответственно ($p < 0,001$). При максимальном времени инкубации 150 минут рост бактериальных клеток не наблюдался. Максимальная концентрация препарата 2 (1 мг/мл) была еще более эффективна по отношению штаммов золотистого стафилококка. При краткосрочной инкубации 30 и 60 мин число бактериальных колоний уменьшалось на 90,55 и 92,78% соответственно ($p < 0,001$). Увеличение времени инкубации до 90, 120 и 150 мин приводи-

ло к полному подавлению роста бактериальных клеток ($p < 0,001$) (табл. 2).

В результате проведенных экспериментов было выявлено выраженное антибактериальное действие препарата 2 (нитропроизводного диацетофенонилселенида) на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Препарат 1 обладал незначительной антибактериальной активностью.

Особый интерес представляет наличие в структуре препарата 2 двух нитрогрупп, что позволяет проводить аналогию с антибактериальным действием нитрофуранов, хотя нитрофураны проявляют широкий спектр антибактериальной активности уже при концентрации 0,5–50 мкг/мл. Установлено [11], что сами по себе НФ антибактериальной активностью не обладают, но приобретают ее при восстановлении флавинзависимыми редуктазами, т.е. для проявления как терапевтического, так и побочного действия НФ необходимо их одноэлектронное восстановление ферментами с нитроредуктазной активностью, локализованными в микробах, простейших или тканях организма [12]. Промежуточные продукты последовательных одно- или двухэлектронных этапов восстановления являются высоко реакционноспособными, особенно анион нитрорадикала, благодаря которому нитрофураны приобретают антибактериальную, противоопухолевую и генотоксическую активность.



Таблица 2

Антибактериальное действие препарата 2 на клинические штаммы золотистого стафилококка

Время воздействия, мин	Количество колоний на твердых питательных средах				
	Контроль (ДМФА и физ. р-р)	Опытные группы, концентрация вещества, мг/мл			
		1	0,1	0,01	0,001
30	974 (897;1078)	92(69;131) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	455(386;511) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	891(784;908) $Z_x = 2.30$; $p_k = 0.021135$	1125(1067;1278) $Z_x = 2.26$; $p_k = 0.023343$
60	956 (896;1078)	69(8;143) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	294(239;378) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	695(567;842) $Z_x = 3.02$; $p_k = 0.002497$	1017(874;1089) $Z_x = 0.15$; $p_k = 0.879829$
90	960 (811;1089)	0(0;23) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	339(167;450) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	903(674;972) $Z_x = 1.39$; $p_k = 0.161973$	905(870;978) $Z_x = 0.18$; $p_k = 0.850107$
120	942 (891;1156)	0(0;0) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	151(60;458) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	876(763;906) $Z_x = 2.19$; $p_k = 0.028366$	976(844;1264) $Z_x = 0.07$; $p_k = 0.939743$
150	1023 (871;1167)	0(0;0) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	0(0;6) $Z_x = 3.77$; $p_k = 0.000157$	797(677;1104) $Z_x = 1.66$; $p_k = 0.096305$	1138(1103;1278) $Z_x = 1.85$; $p_k = 0.064023$

В результате проведенных экспериментов было выявлено выраженное антибактериальное действие препарата 2 (нитропроизводного диацетофенилселенида) на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Препарат 1 обладал незначительной антибактериальной активностью.

Особый интерес представляет наличие в структуре препарата 2 двух нитрогрупп, что позволяет проводить аналогию с антибактериальным действием нитрофуранов, хотя нитрофураны проявляют широкий спектр антибактериальной активности уже при концентрации 0,5–50 мкг/мл. Установлено [11], что сами по себе НФ антибактериальной активностью не обладают, но приобретают ее при восстановлении флавинозависимыми редуктазами, т.е. для проявления как терапевтического, так и побочного действия НФ необходимо их одноэлектронное восстановление ферментами с нитроредуктазной активностью, локализованными в микробах, простейших или тканях организма [12]. Промежуточные продукты последовательных одно- или двухэлектронных этапов восстановления являются высоко реакционноспособными, особенно анион нитрорадикала, благодаря которому нитрофураны приобретают антибактериальную, противоопухолевую и генотоксическую активность.

В связи с этим можно предположить, что антибактериальная активность препарата 2 обусловлена наличием в его структуре двух нитрогрупп, которые, подвергаясь действию бактериальных ферментов, проявляют свою цитотоксическую активность в отношении штаммов золотистого стафилококка.

Полученные данные позволяют предполагать перспективность использования препарата 2 как антибактериального средства в отношении антибиотикорезистентных штаммов золотистого стафилококка.

Список литературы

- Holl V., Coelho D., Silbernagel L., Keyser J.F., Waltzinger C., Dufour P., Bischoff P.L. Prevention of nitrogen mustard-induced apoptosis in normal and transformed lymphocytes by ebselen // *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 60, № 11. P. 1565–1577.
- Lindenblatt N., Schareck W., Belusa L., Nickels R.M., Menger M.D., Vollmar B. Anti-oxidant ebselen delays microvascular thrombus formation in the rat cremaster muscle by inhibiting platelet P-selectin expression // *Thromb. Haemost.* 2003. Vol. 90, № 5. P. 882–892.
- Sakurai T., Kanayama M., Shibata T., Itoh K., Kobayashi A., Yamamoto M., Uchida K. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. Vol. 19, № 9. P. 1196–1204.
- Wójtowicz H., Kloc K., Maliszewska I., Mlochowski J., Pietka M., Piasecki E. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties // *Pharmacol.* 2004. Vol. 59, № 11. P. 863–868.



5. Chan G., Hardej D., Santoro M., Lau-Cam C., Billack B. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase // J Biochem. Mol. Toxicol. 2007. Vol. 21, № 5. P. 252–264.

6. Pietka-Otlik M., Wójtowicz-Mlochowska H., Kolodziejczyk K., Piasecki E., Mlochowski J. New organoselenium compounds active against pathogenic bacteria, fungi and viruses // Chem Pharm Bull (Tokyo). 2008. Vol. 56, № 10. P. 1423–1427.

7. Nozawa R., Yokota T., Fujimoto T. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the selenium-containing compound 2-phenyl-1,2-benzoselenazol-3(2H)-one (PZ51) // Antimicrob. Agents Chemother. 1989. Vol. 33, № 8. P. 1388–1390.

8. Dodd M. C., Stillman W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives // J. Pharmacol. Exptl. Therap. 1944. Vol. 82. P. 11–18.

9. Левшин И. Б. Новые направления в поиске антимикробных средств в ряду производных тиазолидин-4-она и 4-хинолон-3-карбоновой кислоты: дис. ... д-ра фарм. наук. М., 1999. 25 с.

10. Средство для лечения и профилактики болезней, вызываемых недостаточностью селена в организме сельскохозяйственных животных и птиц / Б. И. Древо, В. А. Антипов, О. И. Жуков и др. // Бюл. изобр. 1996. № 1. Пат. 2051681 РФ.

11. Гасанова З. М. Влияние фуразолидона на стафилококковую инфекцию в эксперименте: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 1966. 22 с.

12. Курпичев В. И. Влияние нитрофурановых препаратов на углеводный обмен золотистого стафилококка: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов. 1972. 23 с.

УДК 599.735.5(470.47)

ФОРМИРОВАНИЕ «МАТЕРИНСКО-ДЕТСКИХ» ОТНОШЕНИЙ У САЙГИ АНТИЛОПЫ

Г.В. Шляхтин, Л.Е. Кокшунова*

Саратовский государственный университет
E-mail: biofac@sgu.ru

* Калмыцкий государственный университет, Элиста
E-mail: bio@kalgmsu.ru



Авторами анализируется формирование «материнско-детских» отношений у сайгака. В работе описано первое вылизывание самкой своего детеныша, который еще не полностью вышел из родовых путей, в результате чего устанавливается контакт и закрепляется ольфакторная связь между матерью и новорожденным, что способствует лучшему выживанию новорожденных и соответственно увеличению численности популяций сайгака.
Ключевые слова: сайгак, вылизывание, связь матери с новорожденным, активный тип матерей.

The Formation of «Paternal-Childish» Links Among Saiga

G.V. Shlyakhtin, L.E. Kokshunova

The authors analyzes the formation of «Paternal-childish» links among Saigas. In this work the author describes the first female saiga licking her half-born calf. As a result, due to licking establishes contact and enhance the ties between mother and newborn calf. The author concludes that female saiga could be attributed to the active mother type as well as female eland antelope.

Key words: saiga, licking, ties between mother and newborn calf, an active mother type.

Сайгак (*Saiga tatarica* Linnaeus, 1758), или степная антилопа, является характерным представителем степей. К сожалению, в последние десятилетия происходит резкое сокращение его численности. Например, в 1960–1980 гг. на степных просторах Казахстана обитало более 1 млн сайгаков, а в

2003 г. его поголовье составило всего 21 тыс. особей. Благодаря комплексу мероприятий Министерства сельского хозяйства Казахстана удалось добиться увеличения численности к 2010 г. до 97.4 тыс. особей. В Республике Калмыкия численность сайгаков в 1998 г. составляла 150 тыс. особей, на следующий год она сократилась втрое (до 50 тыс.), а через год, в 2000 г., еще вдвое, осталось 25 тыс. особей. С этого периода по настоящее время его численность колеблется от 14–15 до 20 тыс. особей. В Саратовской области заходы и размножение сайгаков отмечались в пределах Краснокутского и Питерского районов в первой половине прошлого столетия, но в последующем достоверных сведений о регистрации вида в регионе не было.

Главной причиной снижения численности сайгаков является браконьерство, совершаемое на всем протяжении его ареала и во все сезоны года. Браконьерство стимулирует спрос не только на мясо, но особенно на сайгачьи рога, применяющиеся в качестве лекарственного сырья в восточной медицине. Поскольку рога имеют только самцы, то их