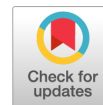


АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА ГИДРОХЛОРИДА ПО ОТНОШЕНИЮ К МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫМ ШТАММАМ МИКРООРГАНИЗМОВ



О.С. Очиров¹, Е.Г. Бурасова², С.А. Стельмах¹, М.Н. Григорьева¹,
В.О. Окладникова¹, Д.М. Могнонов¹

¹ ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия

² Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия

Резюме. Одной из актуальных проблем здравоохранения является устойчивость бактерий к применяемым дезинфицирующим средствам, способствующая формированию и распространению резистентных штаммов. Такая устойчивость резко снижает эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий и способствует поддержанию высокого уровня заболеваемости. В условиях роста заболеваемости ИСМП, их полиэтиологичности, большого адаптационного потенциала условно-патогенных микроорганизмов, нарастания устойчивости к антимикробным препаратам назрела необходимость разработки новых или модификации существующих веществ растительного или синтетического происхождения, обладающих антимикробным действием и используемых в качестве антимикробных агентов. К представителям такого класса соединений относятся полигуанидины, которые характеризуются высокой антимикробной активностью и низкой токсичностью. Благодаря высокой реакционной способности гуанидиновой группировки, а также простоте синтеза и относительной доступности сырья методом поликонденсации в расплаве были получены N-фенил- и N-октилзамещенные производные полигексаметиленгуанидина гидрохлорида, определены их молекулярно-массовые характеристики, методом ИК-спектроскопии исследовано строение. Ранее проведенное исследование острой токсичности производных полигексаметиленгуанидина гидрохлорида после однократного поступления препаратов в организм лабораторных животных (белых мышей) пероральным путем позволило установить следующие значения LD₅₀: полигексаметиленгуанидина гидрохлорид — 850,0±112,02 мг/кг; N-фенилзамещенный полигексаметиленгуанидина гидрохлорид — 1399,9±120,51 мг/кг; N-октилзамещенный полигексаметиленгуанидина гидрохлорид — 1150,0±137,40 мг/кг. Полученные значения позволяют отнести синтезированные производные к четвертому классу опасности и открывают возможность их применения в качестве активных компонентов дезинфицирующих средств. Оценка антибактериальных свойств образцов проводили методом серийных разведений в агаре на госпитальных штаммах бактерий и грибов, выде-

Адрес для переписки:

Очиров Олег Сергеевич
670047, Россия, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ,
ул. Сахьяновой, 6, ФГБУН Байкальский институт
природопользования Сибирского отделения РАН.
Тел.: 8 983 531-42-42.
E-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Contacts:

Oleg S. Ochirov
670047, Russian Federation, Republic of Buryatia,
Ulan-Ude, Sakhyanova str., 6, Baikal Institute of Nature Management
of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 983 531-42-42.
E-mail: ochirov.o.s@yandex.ru

Для цитирования:

Очиров О.С., Бурасова Е.Г., Стельмах С.А., Григорьева М.Н.,
Окладникова В.О., Могнонов Д.М. Антимикробная активность
производных полигексаметиленгуанидина гидрохлорида
по отношению к мультирезистентным штаммам микроорганизмов //
Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 1. С. 193–196. doi: 10.15789/2220-
7619-AAO-1751

Citation:

Ochirov O.S., Burasova E.G., Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N.,
Okladnikova V.O., Mogonov D.M. Antimicrobial activity
of polyhexamethylene guanidine hydrochloride derivatives against multi-
resistant microbial strains // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 193–196. doi: 10.15789/2220-
7619-AAO-1751

Исследование выполнено при финансовой поддержке гос. задания Байкальского института природопользования СО РАН № 0273-2021-0007.

The study was financially supported by the state assignment of the Baikal Institute of Nature Management SB RAS.

ленных из биоматериала пациентов Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко, согласно клиническим рекомендациям «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» 2014 г., «Бактериологический анализ мочи» 2014 г., «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г. Установлено, что N-замещенные производные проявляют большее антимикробное действие, чем вещества с незамещенным полимером. Наиболее чувствительными ко всем представленным препаратам являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* (№ 2495) (полное угнетение), а также метициллин-резистентный *S. aureus* (№ 2544), причем замещенные образцы практически полностью подавляют его рост. Наиболее устойчивыми штаммами являются *P. aeruginosa* (№ 2281), *A. baumannii* (№ 2806) и *K. pneumoniae* (№ 3023), процент редукции этих бактерий при действии замещенных образцов не превышает 41%, что объясняется их мультирезистентностью.

Ключевые слова: полигуанидины, поликонденсация, дезинфицирующие средства, антимикробное действие, резистентные штаммы.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE HYDROCHLORIDE DERIVATIVES AGAINST MULTI-RESISTANT MICROBIAL STRAINS

Ochirov O.S.^a, Burasova E.G.^b, Stelmakh S.A.^a, Grigor'eva M.N.^a, Okladnikova V.O.^a, Mognonov D.M.^a

^a Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation

^b Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation

Abstract. The resistance of bacteria to the disinfectants used is one of the pressing health problems requiring to be addressed in order to prevent formation and spread of resistant strains. Bacterial resistance leads to a sharply decreased effectiveness of anti-epidemic measures and contributes to maintaining a high morbidity level. In the context of the growing HAI incidence rate and related polyetiology, the large adaptive potential of opportunistic microorganisms, and the growing resistance to antimicrobial drugs, it is necessary to search for new or modify the corresponding substances of plant or synthetic origin exerting antimicrobial action used as antimicrobial agents. One of the representatives of this class of compounds are polyguanidines, characterized by high antimicrobial activity and low toxicity. Due to the high reactivity of the guanidine group, as well as ease of synthesis and relative availability of raw materials, N-phenyl- and N-octyl-substituted derivatives of polyhexamethylene guanidine hydrochloride were able to be obtained by melt polycondensation, their molecular weight characteristics were measured as well as the structure investigated by IR spectroscopy. An earlier study on the acute toxicity for polyhexamethylene guanidine hydrochloride derivatives after a single oral intake in laboratory animals (white mice) allowed to establish the following LD₅₀ values: polyhexamethylene guanidine hydrochloride — 850.0±112.02 mg/kg; N-phenyl-substituted polyhexamethylene guanidine hydrochloride — 1399.9±120.51 mg/kg; N-octyl-substituted polyhexamethylene guanidine hydrochloride — 1150.0±137.40 mg/kg. Such values, according to the tabulation of hazard classes, allow the synthesized derivatives to be classified into the fourth hazard class and open up an opportunity for using disinfectants as active components. The evaluation of the antibacterial sample properties was carried out by using serial dilutions in agar on hospital bacterial and fungal strains isolated from the biomaterial of patients at the Republican Clinical Hospital named after V.I. Semashko, according to the clinical guidelines “Laboratory diagnosis of community-acquired pneumonia” 2014, “Bacteriological analysis of urine” 2014, “Determination of the susceptibility of microorganisms to antimicrobial drugs” 2015. It was found that N-substituted derivatives exhibit a greater antimicrobial effect compared with unsubstituted polymer. The most sensitive to all the drugs presented was the yeast-like fungi *Candida albicans* (No. 2495) (complete suppression), as well as methicillin-resistant *S. aureus* (no. 2544), and the substituted samples almost completely suppress its growth. The most resistant strains are *P. aeruginosa* (No. 2281), *A. baumannii* (No. 2806) and *K. pneumoniae* (No. 3023), the percentage of reduction of these bacteria under the action of substituted samples does not exceed 41%, which is accounted for by their multi-resistance.

Key words: polyguanidines, polycondensation, disinfectants, antimicrobial action, resistant strains.

Введение

Одной из актуальных проблем здравоохранения является устойчивость бактерий к применяемым дезинфицирующим средствам (ДС), способствующая формированию и распространению резистентных штаммов. В медицинской литературе описаны случаи недостаточного эффективного применения ДС в отношении клинических штаммов микроорганизмов, вслед-

ствие чего патогенная и условно-патогенная микрофлора не только сохранялась длительное время на объектах внешней среды, но и накапливалась в готовых растворах дезинфектантов; отмечались случаи, когда контаминированные бактериями растворы послужили факторами передачи инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [4]. Решение данной проблемы возможно путем поиска новых или модификации существующих веществ синтетичес-

кого или растительного происхождения, обладающих антимикробным действием. К представителям такого класса соединений относятся полигуанидины, которые характеризуются высокой антимикробной активностью, низкой токсичностью и широко используются в качестве основного действующего вещества многих ДС [2]. Высокая реакционная способность гуанидиновой группировки открывает широкие возможности модификации полимерной структуры, что, вероятно, позволит повысить антимикробную активность и безопасность полимеров, получающихся в результате синтеза.

Материалы и методы

Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГГх) и его N-фенил- и N-октилзамещенные производные были синтезированы и исследованы с помощью методов, описанных в работе [7].

Оценку антибактериальных свойств образцов проводили методом серийных разведений в агаре на госпитальных штаммах бактерий и грибов — *Candida albicans* (№ 2495), метициллин-резистентного *S. aureus* (№ 2544), *P. aeruginosa* (№ 2281), *A. baumannii* (№ 2806) и *K. pneumoniae* (№ 3023), — выделенных из биологического материала пациентов Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко согласно клиническим рекомендациям «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний» 2014 г., «Бактериологический анализ мочи» 2014 г., «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г.

Для получения вегетативных клеток штаммы микроорганизмов инкубировали в жидкой питательной среде при аэробных условиях в шейкере-инкубаторе Biosan ES-20 (180 об/мин, 37°C) в течение 24 ч. Вегетативные клетки каждого тест-объекта были приготовлены в стерильном буферном растворе из соответствующих односуточных культур методом предельных разведений [1, 6]. Полученные бактериальные суспензии содержали от 10^2 до 10^3 КОЕ/мл. В асептических условиях тщательно смешивались 20 мл агаризованного мясopептонного бульона, разогретого до 50°C, и 0,05 мл 1% раствора исследуемых (со)полимеров непосредственно в чашке Петри. Параллельно с чашками Петри, содержащими растворы (со)полимеров, для контроля роста тест-объектов приготовили чашки без антимикробных препаратов. После застывания агаризованного бульона и подсушивания чашек производили инокуляцию по 0,1 мл суспензии на подготовленные твердые питательные среды в пяти повторностях и инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч для подсчета выживших КОЕ.

Таблица. Антимикробное действие ПГМГГх и его N-замещенных производных на мультирезистентные штаммы

Table. Antimicrobial action of PGMGHC and its N-substituted derivatives on multi-resistant strains

| Микроорганизмы Microorganisms | ПГМГГх PHMGHC | N-октил ПГМГГх N-octyl PHMG-P | N-фенил ПГМГГх N-phenyl PHMG-P |
|----------------------------------|---------------------------|--|---|
| | % редукции/% of reduction | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | – | 17 | – |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 20 | – | 40 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 33 | – | 41 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 70 | 97 | 95 |
| <i>Candida albicans</i> | 100 | 100 | 100 |

Антимикробные свойства образцов оценивали с помощью процента редукции микроорганизмов (% редукции), который вычисляли по следующей формуле:

$$\% \text{ редукции} = 100 - \frac{NT \times 100}{NK},$$

где NK — количество микробных клеток в контроле, NT — количество микробных клеток в опыте.

Результаты и обсуждение

Известно [3], что ряд условно-патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) представляют наибольшую опасность как возбудители внутрибольничных инфекций, а их широкая распространенность (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* суммарно составляют более 50% в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций) [5] и выраженная способность приобретать резистентность к антимикробным препаратам требует применения новых высокоэффективных ДС для борьбы с ними.

Так, ранее были проведены работы по синтезу новых производных ПГМГГх [7] для получения эффективных и безопасных антимикробных агентов. Проведенные работы показали, что наиболее чувствительными ко всем представленным препаратам являются дрожжеподобные грибы *Candida albicans* (полное угнетение), а также метициллин-резистентный *S. aureus*, причем замещенные образцы практически полностью подавляли его рост. Наиболее устойчивыми штаммами являлись *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*. Процент подавления роста этих бактерий при действии замещенных образцов не превышал 41%, что, по-видимому, объясняется их мультирезистентностью (табл.).

Заключение

Таким образом, установлено, что N-замещенные производные ПГМГх проявляют антимикробную активность относительно резистентных штаммов бактерий. По внутрижелудочной токсичности все исследованные препараты относят-

ся к четвертому классу опасности. Особый интерес представляет N-фенилзамещенный ПГМГх как обладающий большей антимикробной активностью и низкой токсичностью. Таким образом, представляется возможным создание новых эффективных дезинфицирующих препаратов на основе модификаций полигуанидинов.

Список литературы/References

1. Афиногенов Г.Е., Панарин Е.Ф. Антимикробные полимеры. СПб.: Гиппократ, 1993. 264 с. [Afinogenov G.E., Panarin E.F. Antimicrobial polymers. St. Petersburg: Hippocrates, 1993. 264 p. (In Russ.)]
2. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины — дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. М.: ЛКМ-пресс, 2009. 303 с. [Vointseva I.I., Gembitskiy P.A. Polyguanidines — disinfectants and multifunctional additives in composite materials. Moscow: LKM-Press, 2009. 303 p. (In Russ.)]
3. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Тепаев Р.Ф., Карасева О.В., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенный в педиатрических ОРИТ г. Москвы // Антибиотики и химиотерапия. 2016. Т. 61, № 7–8. С. 22–26. [Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Alyabieva N.M., Tepaev R.F., Karaseva O.V., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. Antibiotic resistance and its molecular mechanisms in carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* isolated in pediatric ICUs in Moscow. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2016, vol. 61, no. 7–8, pp. 22–26. (In Russ.)]
4. Шкарин В.В., Саперкин Н.В., Ковалишена О.В., Благоднарова А.С., Широкова И.Ю., Куликина А.А. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам: итоги и перспективы // Медицинский альманах. 2012. Т. 3, № 22. С. 122–125. [Shkarin V.V., Saperkin N.V., Kovalishena O.V., Blagonravova A.S., Shirokova I.Yu., Kulyukina A.A. The regional monitoring of microorganisms resistance to disinfectants: results and perspectives. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2012, vol. 3, no. 22, pp. 122–125. (In Russ.)]
5. Яковлев С.В., Проценко Д.Н., Шахова Т.В., Суворова М.П., Рамишвили В.Ш., Игнатенко О.В., Ярощевский А.И., Романовский Ю.Я., Еремина Л.В. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию? // Антибиотики и химиотерапия. 2010. Т. 55, № 1–2. С. 50–58. [Yakovlev S.V., Protsenko D.N., Shakhova T.V., Suvorova M.P., Ramishvili V.S., Ignatenko O.V., Yaroshetsky A.I., Romanovsky Yu.Ya., Eremina L.V. Antibiotic resistance in hospital: do we control the situation? *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2010, vol. 55, no. 1–2, pp. 50–58. (In Russ.)]
6. Albert M., Feiertag P., Hayn G. Structure-activity relationships of oligoguanidines influence of counterion, diamine, and average molecular weight on biocidal activities. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, pp. 1811–1817. doi: 10.1021/bm0342180
7. Stelmakh S.A., Grigor'eva M.N., Garkusheva N.M., Lebedeva S.N., Ochirov O.S., Mogonov D.M., Zhamsaranova S.D., Batoev V.B. Studies of new biocidal polyguanidines: antibacterial action and toxicity. *Polymer Bulletin*, 2020, vol. 78, pp. 1997–2008. doi: 10.1007/s00289-020-03197-1

Авторы:

Очиров О.С., к. фарм.н., ведущий инженер лаборатории химии полимеров ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия;

Бурасова Е.Г., врач-бактериолог высшей категории, зав. бактериологической лабораторией Республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия, Россия;

Стельмах С.А., к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии полимеров ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия;

Григорьева М.Н., к.х.н., ведущий инженер лаборатории химии полимеров ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия;

Окладникова В.О., инженер лаборатории химии полимеров ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия;

Могнонов Д.М., д.х.н., главный научный сотрудник лаборатории химии полимеров ФГБУН Байкальский институт природопользования Сибирского отделения РАН, г. Улан-Удэ, Республика Бурятия.

Authors:

Ochirov O.S., PhD (Pharmacology), Leading Engineer, Laboratory of Polymer Science, Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation;

Burasova E.G., Board Certified Bacteriologist, Head of the Bacteriological Laboratory, Republican Clinical Hospital named after N.A. Semashko, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation;

Stelmakh S.A., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Polymer Science, Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation;

Grigor'eva M.N., PhD (Chemistry), Leading Engineer, Laboratory of Polymer Science, Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation;

Okladnikova V.O., Engineer, Laboratory of Polymer Science, Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation;

Mogonov D.M., PhD, MD (Chemistry), Head Researcher, Laboratory of Polymer Science, Baikal Institute of Nature Management of the Siberian Branch of the RAS, Ulan-Ude, The Republic of Buryatia, Russian Federation.