

ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-1-13-17

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКОТОКСИНА ПАТУЛИНА *IN VITRO*

О. А. Х. Алмухтар¹, М. С. Джабир², Е. Г. Цублова¹, И. Н. Крылова³

В экспериментах на культуре *S. aureus* была исследована антибактериальная активность микотоксина патулина в чистом виде и в сочетании с наночастицами коллоидного золота. Установлено, что максимальный антибактериальный эффект наблюдается при совместном применении патулина и наночастиц золота в концентрациях 200 мкг/мл каждый. При этом зона ингибирования роста колонии *S. aureus* увеличивалась до $30,9 \pm 1,5$ мм ($p < 0,001$) в сравнении с раздельным действием патулина ($15,80 \pm 0,42$ мм) ($p < 0,001$) и наночастиц золота ($19,67 \pm 1,32$ мм) ($p < 0,001$). На фоне действия патулина, наночастиц золота и при их совместном использовании отмечали нарушение морфологии мембран, протопласта и снижение тургора клеток бактерий. В механизме антибактериального действия патулина и наночастиц золота значимым элементом является их окислительная активность.

Ключевые слова: микотоксин патулин; наночастицы золота; *S. aureus*; антибактериальная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Микотоксины — группа биологически активных веществ, вторичных метаболитов, продуцируемых организмами Царства Грибы (*Mycota*) [1, 3, 4]. Обнаружение антибактериальных свойств у некоторых грибов с последующим выделением активных молекул дало начало эре антибиотиков. Первоначальное применение микотоксинов разных групп в целях разработки антибактериальных веществ, начиная с первой половины XX в., сохраняет свою актуальность и в настоящее время. Это обусловлено с одной стороны расширением генетического разнообразия потенциальных бактериальных патогенов, а с другой стороны — крайне высокой устойчивостью штаммов микроорганизмов из-за бесконтрольного использования антибактериальных лекарственных средств (ЛС) [2].

Патулин был впервые идентифицирован в 1943 г. под названием терцинин как возможное противомикробное средство [14]. Однако эти исследования были прекращены в связи с обнаружением у патулина в действующих дозах гепато-, нефро-, гемато- и нейротоксичности [5, 10, 11, 13]. Тем не менее, исследование антибактериальной активности патулина в широком

диапазоне доз, в значениях ниже ЛД₅₀, позволит обнаружить эффективные количества вещества, не оказывающие токсического действия на клетки организма человека.

В ряде исследований также было показано, что антибактериальная активность веществ различной природы может быть усилена с помощью добавления наночастиц золота. При этом наблюдается проявление фармакологического действия соединения в более низких концентрациях [9, 15].

Целью нашего исследования являлось изучение активности микотоксина патулина и наночастиц золота в отношении штаммов *S. aureus*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве материалов исследований были использованы водные растворы патулина (готовили из стандарта сухого для хроматографии, TRC, Канада) с концентрацией вещества 25, 50, 100 и 200 мкг/мл. В качестве дополнения использовали раствор коллоидных наночастиц золота (диаметр 20 нм, Sigma-Aldrich, США) в воде в аналогично патулину концентрациях: 25, 50, 100 и 200 мкг/мл. Подтверждение размера наночастиц золота проводили методом УФ-спектрометрии [12]. При совместном воздействии исследованных веществ готовили водный раствор патулина и наночастиц золота в концентрации 1 мг/мл, после чего разводили натрий-фосфатным буфером до необходимой концентрации.

Антибактериальная активность патулина и наночастиц золота была исследована в отношении грамполо-

¹ ФГБОУ ВО Брянский государственный университет имени академика И. Г. Петровского, Россия, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14.

² Багдадский технологический университет, Ирак, Багдад, Аль-Синаа.

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

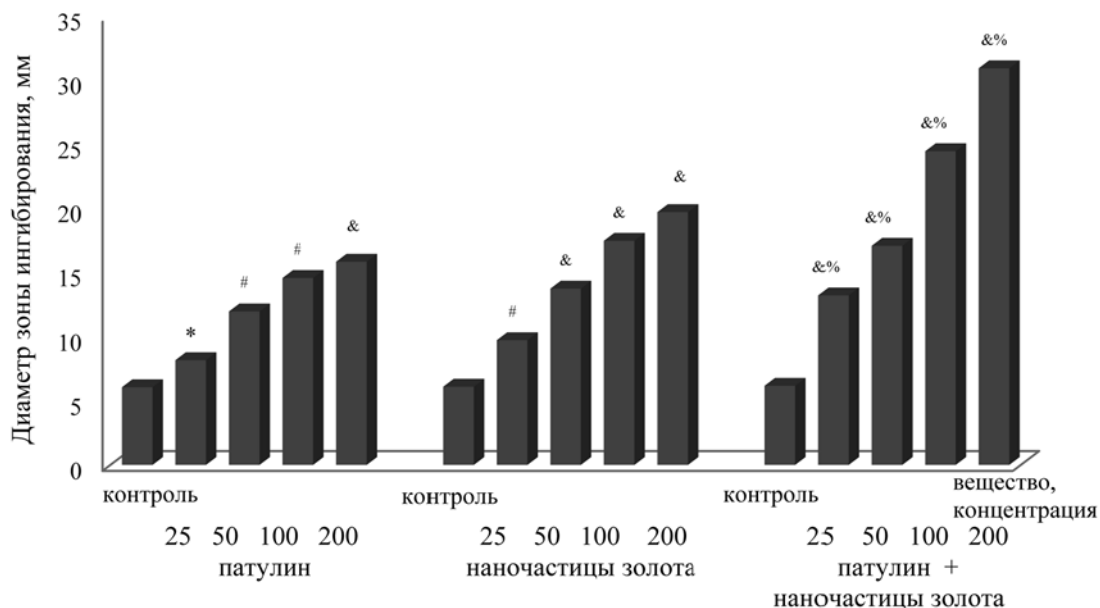


Рис. 1. Антибактериальная активность (диаметр зоны ингибирования, мм) исследованных веществ в отношении *S. aureus*. Достоверные различия с контролем: * $p < 0,05$, # $p < 0,01$, & $p < 0,001$; достоверные различия с монопрепаратами: % $p < 0,001$.

жительного бактериального штамма *S. aureus* (Департамент биотехнологических исследований Багдадского технологического университета, Ирак) с использованием метода диффузии в лунках агарной среды Мюллера-Хинтона. После культивирования бактерий на чашках с агаром с помощью стерильного пробочного сверла делали лунки диаметром 6 мм, глубиной 4 мм, в которые добавляли растворы с разными концентрациями патулина и наночастиц золота (25, 50, 100, 200 мкг/мл). Чашки с культурами инкубировали в течение суток при 37 °С в термостате. Затем с помощью линейки-лекала определяли диаметр зоны ингибирования роста колонии бактерий (мм). Полученные результаты сравнивали с контролем (раствор ДМСО). Эксперименты проводили в трех повторениях [8].

Изучение морфологии клеток штамма *S. aureus* проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа (TESCAN, Vega III, Чехия). Культуру бактерий инокулировали в питательной среде в присутствии и в отсутствие наночастиц золота (Sigma, США), после чего полученную суспензию наносили на чистые предметные кремниевые пластины и микроскопировали [7].

Исследование жизнеспособности клеток штамма *S. aureus* определяли по степени высвобождения активных форм кислорода. Интенсивность выделения указанных веществ определяли методом флуоресценции клеток после окрашивания акридиновым оранжевым/бромидом этидия (АО/EtBr). 50 мкл бактериальной суспензии обрабатывали раствором исследованного вещества (патулин, наночастицы золота или их комбинация в указанных выше концентрациях), после чего смешивали с 50 мкл АО/EtBr (10 мкг/мл) и оставляли на 2 мин для окрашивания, затем исследовали

под иммунофлуоресцентным микроскопом Daffodil MCX100 micros (Австрия). Наличие/отсутствие жизнедеятельности клеток оценивали по изменению спектра флуоресценции [6].

Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием параметрического метода (t -критерий Стьюдента). Достоверными считали различия с контролем при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что микотоксин патулин в чистом виде и в сочетании с наночастицами золота обладает способностью ингибировать развитие колонии *S. aureus*. Выраженность этого действия зависит от концентрации (рис. 1). Размер зоны ингибирования на фоне действия патулина в концентрации 25 мкг/мл был наименьшим и составил $8,17 \pm 0,49$ мм или 35 % к контролю ($6,06 \pm 1,76$ мм), принятому за 100 %, а в концентрации 200 мкг/мл — $15,80 \pm 0,42$ мм (или 161 % в сравнении с контролем). Эффективность наночастиц золота в указанных условиях так же, как и в случае с патулином, зависела от концентрации вещества, однако величина ингибирования превышала контрольные значения на 59 % в концентрации 25 мкг/мл и на 223 % в концентрации 200 мкг/мл.

Патулин и наночастицы золота при совместном действии проявляли синергичный эффект. Минимальное ингибирование наблюдалось при концентрации веществ 25 мкг/мл, максимальное — 200 мкг/мл. Диапазон действия был выше контрольных значений на 113 и 401 % соответственно. Степень антимикробного эффекта при совместном применении исследованных веществ была выше в среднем в 1,5–2 раза в сравне-

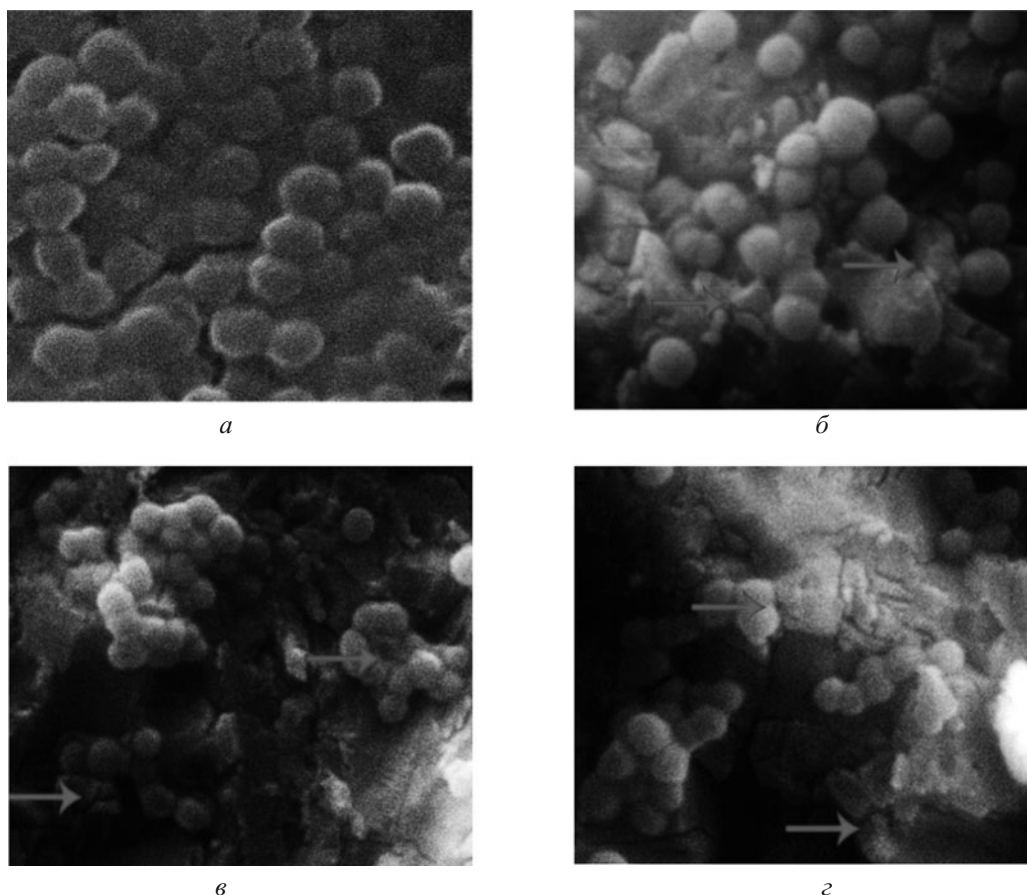


Рис. 2. Изображения клеток колонии *S. aureus* (сканирующая микрофотография):

a — контрольный необработанный бактериальный штамм *S. aureus*; *б* — *S. aureus*, обработанный патулином в концентрации 100 мкг/мл; *в* — *S. aureus*, обработанный наночастицами золота в концентрации 100 мкг/мл; *г* — *S. aureus*, обработанный патулином и наночастицам золота в концентрации 100 мкг/мл. Красными стрелками показаны нарушения структуры клеток бактерий: повреждения, фрагментарное слипание клеточной мембраны, сморщивание вследствие снижения тургора.

нии с раздельным действием патулина и наночастиц золота.

Можно предположить, что наночастицы золота способны потенцировать антибактериальное действие патулина в отношении бактерий *S. aureus*, что согласуется с литературными данными [9, 15].

Исследование морфологии клеток бактерий *S. aureus* проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Полученные изображения отражают различия в клеточных структурах бактерий, обработанных патулином и наночастицами золота, по сравнению с интактным (контрольным) штаммом бактерий (рис. 2, *a*). На рисунке представлены результаты действия исследованных веществ в концентрации 100 мкг/мл.

Клетки колонии *S. aureus* обычно существуют в виде кластеров, которые разрушались после обработки исследованными веществами. Патулин и наночастицы золота обладали умеренной активностью в отношении бактериального штамма при их раздельном использовании, что проявлялось в структурных изменениях бактериальных клеток (рис. 2, *б*, *в*). При комбинированном воздействии патулина и наночастиц зо-

лота (рис. 2, *г*) наблюдалось более выраженное влияние на внешнюю мембрану тестируемых микроорганизмов, что подтверждается наличием большого количества пор на клеточной мембране штаммов бактерий, истечением протопласта клеток из-за осмотического дисбаланса и последующими изменениями нормальной формы. СЭМ-изображения продемонстрировали большую агрегацию и разрыв мембран штаммов после обработки патулином и наночастицами золота, по сравнению с необработанной культурой. Кроме того, наблюдалось появление аномальных структур, разрывов, повреждений и пузырей на мембране бактериальных клеток, что может быть обусловлено нарушением потенциала на поверхности мембраны, и, как следствие, увеличением поверхностного натяжения протопласта клеток.

Продукция активных форм кислорода бактериальным штаммом после обработки патулином и наночастицами золота определялась с использованием метода окрашивания акридиновым оранжевым/бромидом этидия. Эти соединения при контакте с активными формами кислорода, продуцируемыми организмами в состоянии окислительного стресса, окисляются. Ком-

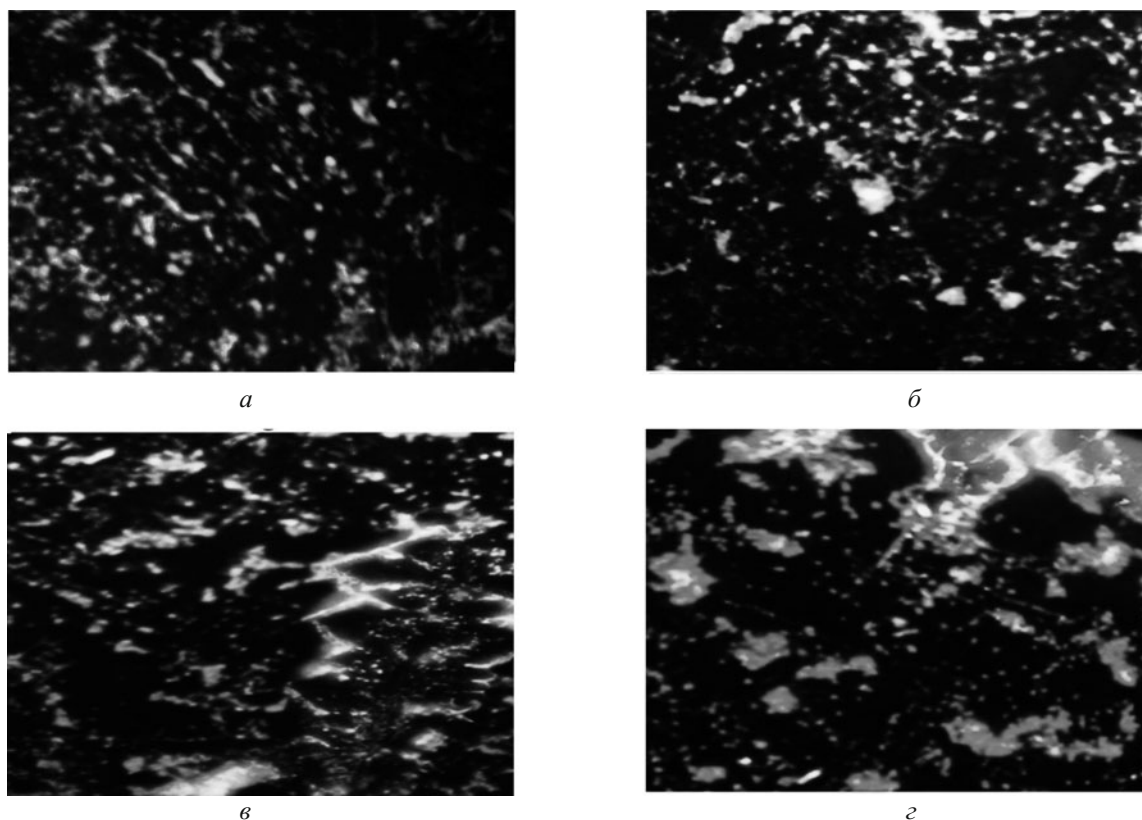


Рис. 3. Фото клеток *S. aureus*, окрашенных акридиновым оранжевым/бромидом этидия (сканирующая микрофотография):

a — контрольный необработанный бактериальный штамм; *б* — *S. aureus*, обработанный патулином (100 мкг/мл); *в* — *S. aureus*, обработанный наночастицами золота (100 мкг/мл); *г* — *S. aureus*, обработанный патулином и наночастицами золота (100 мкг/мл + 100 мкг/мл).

понтент бромид этидия проникает только в клетки с нарушенными мембранами и взаимодействует с нуклеиновыми кислотами клеток. Жизнеспособные клетки окрашиваются в зеленый цвет (рис. 3, *a*), а нежизнеспособные клетки с повреждением нуклеоида окрашиваются в оттенки красного цвета. Анализ микрофотографий, проведенных с помощью Adobe Photoshop CC 2018, показал, что под влиянием патулина (рис. 3, *б*) и наночастиц золота (рис. 3, *в*) наблюдалась достоверная ($p < 0,05$) гибель $26,03 \pm 1,1$ и $33,41 \pm 3,6$ % клеток колонии соответственно. Совместное влияние патулина и наночастиц золота (рис. 3, *г*) способствовало гибели $51,31 \pm 2,4$ % клеток колонии.

Таким образом, микотоксин патулин обладает антибактериальной активностью, зависимой от концентрации, в отношении клеток *S. aureus*. Такое же действие наблюдается и в отношении наночастиц золота, а также при совместном влиянии указанных соединений. Следовательно, микотоксин патулин можно рекомендовать для дальнейшего исследования его фармакологических свойств (антибактериальное действие в отношении иных штаммов микроорганизмов, цитостатическое действие и пр.). Проведение дополнительных исследований биологической активности в широком диапазоне концентраций позволит выявить эффектив-

ные концентрации патулина, в которых это вещество не оказывает токсического действия на организм человека. Целесообразно исследовать на аналогичных тестах и влияние наночастиц золота, а также их комбинацию с патулином для создания комплексного антибактериального ЛС. При разработке ЛС на основе обоих исследованных соединений в перспективе целесообразно изучить вариант создания транспортных наночастиц на основе коллоидного золота, обеспечивающих адресную доставку патулина в пораженные бактериями структуры. При таком подходе возможно сохранить сочетанное воздействие обоих веществ непосредственно в клетке.

ВЫВОДЫ

1. Патулин в концентрациях 25 – 200 мкг/мл вызывает увеличение зоны ингибирования роста колонии *S. aureus* на 35 – 161 %, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$).
2. Наночастицы золота в концентрациях 25 – 200 мкг/мл вызывают увеличение зоны ингибирования роста колонии *S. aureus* на 113 – 401 %, по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$).
3. Комбинация патулина и наночастиц золота превосходит антибактериальный эффект патулина в концентрациях 25 – 200 мкг/мл на 79 – 240 % и наноча-

стиц золота в тех же концентрациях на 51 – 178 % при $p < 0,001$.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Баранова, В. А. Алферова, В. А. Коршун, А. П. Тюрин, *Биоорганическая химия*, **46**(6), 593 – 665, (2020); doi: 10.31857 / S0132342320060020
2. Е. Н. Карева, С. Ю. Сереброва, Н. Б. Лазарева и др., *Экспериментальная и клиническая фармакология*, **81**(9), 26 – 32, (2018); doi: 10.30906 / 0869-2092-2018-81-9-26-32
3. И. Л. Кузикова, Н. Г. Медведева, *Экология человека*, **3**, 4 – 14 (2021); doi: 10.33396 / 1728-0869-2021-3-4-14
4. Б. А. Рамазанова, Д. Ж. Батырбаева, А. Н. Бекназарова, *Вестник Казахского Нац. мед. ун-та*, **3**, 47 – 55 (2015).
5. Q. Chu, S. Wang, L. Jiang, et al., *Food Chem. Toxicol.*, **147**(1), 111867 (2021); doi: 10.1016 / j.fct.2020.111867
6. Q. A. Drmosh, M. A. Gondal, Z. H. Yamani, T. A. Saleh, *Appl. Surf. Sci.*, **256**(14), 4661 – 4666 (2010); doi: 10.1016 / j.ap-susc.2010.02.068
7. M. S. Jabir, A. A. Taha, U. I. Sahib, *Artificial Cells, Nanomed. and Biotechnol.*, **46**(2), 345 – 355 (2018); doi: 10.1080 / 21691401.2018.1457535
8. Kh. S. Khashan, F. A. Abdulameer, M. S. Jabir, A. A. Hadi, *Nanosci. and Nanotechnol.*, **11**(3), 035010 (2020).
9. D. P. Linklater, V. A. Baulin, X. Le Guével, et al., *Adv. Mater. Dec.*, **32**(52), e2005679 (2020); doi: 10.1002 / adma.202005679
10. Ya. Pillay, S. Nagiah, A. Phulukdaree, et al., *Sci. Rep.*, **18** **10**(1), 20115 (2020); doi: 10.1038 / s41598-020-77157-0
11. I. Saleh, I. Goktepe, *Food Chem Toxicol.*, **129**(7), 301 – 311 (2019); doi: 10.1016 / j.fct.2019.04.036
12. Gh. M. Sulaiman, H. M. Waheeb, M. S. Jabir, et al., *Sci Rep.*, Jun 9, **10**(1), 9362 (2020); doi: 10.1038 / s41598-020-66419-6
13. K. Tokarova, Ja. Vasicek, R. Jurcik, et al., *J. Environ. Sci. Health B.*, **54**(6), 459 – 466 (2019); doi: 10.1080 / 03601234.2019.1575673
14. A. Vidal, S. Ouhibi, R. Ghali, et al., *Food Chem Toxicol.*, **129**(7), 249 – 256 (2019); doi: 10.1016 / j.fct.2019.04.048
15. Y. Xie, J. Yang, J. Zhang, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Dec 21, **59**(52), 23471 – 23475 (2020); doi: 10.1002 / anie.202008584

Поступила 12.10.21

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PATULIN MYCOTOXIN *IN VITRO*

O. A. Kh. Almukhtar¹, M. S. Dzhabir², E. G. Tsublova¹, and I. N. Krylova³

¹ I. G. Petrovsky Bryansk State University, ul. Bezhitskaya 14, Bryansk, 241036 Russia

² Baghdad University of Technology, Al Sinaa Baghdad, Iraq

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/1, Moscow, 119991 Russia

The antibacterial activity of patulin mycotoxin in pure form and in combination with colloidal gold nanoparticles was investigated in experiments on the *S. aureus* culture. The maximum antibacterial effect has been observed for the combined use of patulin and gold nanoparticles at equal concentrations of 200 µg/ml each. At the same time, the zone of the *S. aureus* colony growth inhibition increased to 30.9 ± 1.5 mm ($p < 0.001$) in comparison to the separate action of patulin (15.80 ± 0.42 mm, $p < 0.001$) and gold nanoparticles (19.67 ± 1.32 mm, $p < 0.001$). The action of patulin, gold nanoparticles, and their combination, was accompanied by violation of the morphology of membranes and protoplast and by decrease in the turgor pressure of bacterial cells. An important element in the mechanism of the antibacterial action of patulin and gold particles is their oxidative activity.

Keywords: mycotoxin; patulin; gold nanoparticles; *S. aureus*; antibacterial activity.