



УДК 576.3+582.28

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРИРОДНЫМ АНТИМИКРОБНЫМ КОМПЛЕКСАМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ – ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РР. CANDIDA И FUSARIUM.***И.Б. Павлова<sup>1</sup>, Го Даньян<sup>2</sup>, Л.Ч. Чен<sup>3</sup>, Т.Г. Юдина<sup>1</sup>*<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия<sup>2</sup>Китайский государственный НИИ пищевой и ферментативной промышленности, Пекин, Китай<sup>3</sup>Шаньдунская академия сельскохозяйственных наук Китая, Цзинань, Китай.

**Аннотация.** Различные микозы и заболевания, связанные с бактериально-грибными патогенами, представляют всё большую опасность из-за быстро распространяющихся устойчивости их возбудителей к используемым противомикробным, в том числе – и противогрибковым средствам, иммунодефицита. Недавно доказано, что только комбинация нескольких антимикробных белков и/или пептидов (АМР) не вызывает возникновения резистентности у патогенов. В связи с этим расширяются исследования антимикробной активности природных, эволюционно сбалансированных комплексов, содержащих АМР. Особое место среди таких комплексов занимает секрет слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. В нашей работе установлено *in vitro*, что молодые гифы гриба *Fusarium oxysporum* и дрожжи *Candida guilliermondii* чувствительны к антимикробному действию растворов секрета слюнных клеток медицинской пиявки, а также водного экстракта разрешённого к клиническому использованию препарата «Пиявит», приготовленного на основе медицинской пиявки. Для изучения антифунгальной активности этих растворов использовали традиционные микробиологические методы, а также электронную микроскопию. Сделано предположение о вероятной перспективности (после дальнейших опытов, в том числе, *in vivo*) использования изучаемых природных антимикробных соединений, не вызывающих резистентности у микроорганизмов, в комплексном лечении микозов у пациентов с ослабленным иммунитетом, нарушениями функционирования сердечно-сосудистой системы, печени, почек, и рядом других заболеваний – вместо традиционно используемых антибиотиков и некоторых других лекарств.

**Ключевые слова.** секрет слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (ССК МП); антимикробные белки и/или пептиды (АМР); природные комплексные противогрибковые средства – антимикотики.

В последние годы различные микозы и заболевания, обусловленные смесью бактериально-грибных патогенов, представляют всё большую опасность из-за быстро распространяющихся устойчивости их возбудителей к применяемым лекарствам, иммунодефицита, а также расширения использования катетеризации, оперативных вмешательств [1, 2]. Эти факторы, наряду с достаточно высокой токсичностью известных антимикотиков, вызывающей множество нежелательных явлений при их применении, определяют не только актуальность поиска новых про-

отивогрибковых средств, но и комплексную стратегию борьбы с микозами [3, 4]. При этом особое внимание стали уделять природным и искусственно созданным антимикробным пептидам (АМР), которые рассматривают, как альтернативу традиционно используемым антибиотикам. Однако, часто препятствием для лечебного применения таких АМР является их высокая гемолитическая активность, а также токсичность для клеток пациентов [4]. Интенсивно изучают механизмы возникновения резистентности грибов к лекарственным препаратам и способы её преодо-

ления [2]. Недавно доказано, что только комбинация нескольких антимикробных белков и/или пептидов (АМР) не вызывает возникновения резистентности у патогенов [5]. В связи с этим расширяются исследования антимикробной активности природных, эволюционно сбалансированных комплексов, содержащих АМР. Особое место среди таких комплексов занимает секрет слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (ССК МП) - основной гуморальный агент, обеспечивающий высокую эффективность лечения пиявками – гирудотерапии (ГТ). В состав ССК МП входит более сотни белков и пептидов и около 200 низкомолекулярных соединений. Особо следует отметить, что ССК МП не токсичен и не вызывает гемолиз эритроцитов [6]. Ранее мы определили *in vitro* антимикробное действие ССК МП на ряд бактерий, а также на дрожжеподобные грибы. Кроме того, установили, что антимикробную активность проявляет и лечебный препарат «Пиявит», приготовленный на основе МП [7, 8]. Показано, что оральный лекарственный препарат «Пиявит», разрешённый к клиническому применению с 1994 г., содержит все компоненты ССК МП, практически полностью сохраняющие свои активности при продолжительном хранении [6]. «Пиявит», который готовят, используя тела МП, содержит ткани и метаболиты последних, а также микроорганизмы микробиома МП и их биологически активные соединения, часть которых способна проявлять антимикробную активность [9, 10]. Следовательно, качественный и количественный состав белков и других соединений в ССК и «Пиявите» существенно различаются. «Пиявит» содержит более разнообразный набор биологически активных соединений, хотя последних, в пересчёте на 1 г препарата, меньше, чем в ССК. Особо следует помнить о наличии в «Пиявите» разных микроорганизмов, присущих пиявкам, на основе которых готовят этот препарат. В настоящее время регистрационный номер «Пиявита» Р N000363/02 от 22.05.2008, он производится Научно-внедренческой фирмой «Гируд И.Н.», в г. Балаково Саратовской области [6].

Секрет своих слюнных клеток медицинские пиявки вводят в кровь пациентов при ГТ, которая в настоящее время всё шире применяется в ряде стран. Применение ГТ для лечения различных

заболеваний, и особенно - в микрохирургии, после реконструктивных и других операций, иногда вызывает воспаление в результате воздействия микросимбионтов МП. Последние могут поступать в кровь из пищеварительного тракта пиявки после отрывки через разрезы в дерме, сделанные челюстями и зубами МП при укусе [6, 9]. Однако, необходимость лечения иногда возникающих послеоперационных осложнений при использовании ГТ не является основанием для хирургов и многих других врачей отказываться от древнего метода ГТ, который, прежде всего, наиболее эффективно восстанавливает микроциркуляцию при венозном застое, а также оказывает антитромботический, антимикробный и ряд других благотворных эффектов [6]. Клиницисты и биологи разрабатывают действенные меры борьбы с возможными осложнениями при ГТ. В качестве наглядного примера можно привести одну из публикаций, в которой описаны новые микросимбионты МП, и, в то же время, определены наиболее подходящие антибиотики и условия для борьбы с возможными воспалениями в результате ГТ [9]. В связи с вышеизложенным исследование антибиотической активности ССК МП в отношении разных микроорганизмов, способных иногда осложнять такие воспаления, является высоко актуальным.

Одними из самых распространённых грибных патогенов животных являются представители р. *Candida*, а среди патогенов растений - представители р. *Fusarium*. Фитопатогенные представители этого рода могут осложнять бактериальные воспаления, а также вызывать микозы у людей и животных с ослабленным иммунитетом. Есть и виды р. *Fusarium*, непосредственно проявляющие токсичность по отношению к человеку и животным. Мицелиальные грибы этого рода отличаются особо высокой устойчивостью к действию большинства антифунгальных соединений [4, 11].

Цель исследования: определение *in vitro* чувствительности *Candida guilliermondii* и *Fusarium oxysporum* к растворам ССК МП *Hirudo medicinalis* и водного экстракта лекарственного препарата «Пиявит» с целью анализа перспектив их использования при комплексном лечении ряда микозов или заболеваний, вызванных смешанной бактериально-грибной инфекцией.

**Материалы и методы исследования.** ССК МП и водный экстракт лекарственного препарата «Пиявит» получали так, как описано нами ранее [8]. Отбирали нативный, свободный от примесей, ССК от МП *H. medicinalis* ранее описанным методом, для чего использовали по 20 особей МП, выращенных на биофабрике и купленных в аптеке. Для получения водного экстракта из лекарственного препарата «Пиявит» суспензию (без капсул) этого препарата настаивали 3 часа в стерильной дистиллированной воде при комнатной температуре, хорошо перемешивая через каждые 15 мин., затем центрифугировали при 11 тыс. об./мин. в течение 15 мин., использовали супернатант. Концентрацию белка в растворах определяли по известному методу Брэдфорд. Работу проводили с растворами концентраций 5 - 250 мкг/мл. Грибы выращивали на сусло-агаре в течение 2 - 4 сут. до получения молодых дрожжевых клеток и мицелия *S. guilliermondii* и *F. oxysporum*, соответственно. Их чувствительность к природным антимикробным комплексам определяли в жидкой и агаризованной среде с пивным суслom. Минимальную ингибирующую и минимальную подавляющую концентрации (МИК и МПК) растворов определяли путем учета антибиотических активностей

ряда разведений и выражали в мкг/мл раствора белка, внесенного в лунку в агаризованной среде или в жидкую среду. Жизнеспособность дрожжеподобных грибов определяли известным способом путём подсчёта колоний, выросших из сохранивших жизнеспособность клеток после влияния на них изучаемых растворов. Изучали изменение морфологии гиф гриба *F. oxysporum* под действием природных антимикробных комплексов в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ). Фиксацию контрольных и опытных суспензий проводили 2,5%-ным глутаровым альдегидом в течение 1 ч; после чего исследуемый материал обезжизняли в спиртах возрастающих концентраций, а затем в абсолютном ацетоне 1 ч, в соответствии с общепринятым методом, и высушивали в критической точке. Напыление образцов проводили платиной на приборе фирмы ЛКВ (Швеция). Форму и поверхность исследуемого материала изучали с помощью микроскопа «JSM-6380» (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кV [8].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Исследуемые растворы ССК и «Пиявита» оказывали антибиотическое действие на клетки *S. guilliermondii* при определении методом диффузии в сусло-агар (таблица 1).

Таблица 1

**Минимальные ингибирующие концентрации растворов ССК МП, водного экстракта препарата «Пиявит» и процентное содержание лизирующихся под их влиянием клеток *Candida guilliermondii***

Раствор антимикробного комплекса	МИК раствора, мкг/мл	% лизирующихся через 3 ч клеток
ССК МП	60	32,7 ± 4,5, p < 0,05
Водный экстракт «Пиявита»	90	25,7 ± 3,8, p < 0,05

В богатой восстановленными веществами среде с пивным суслom МИК растворов ССК и «Пиявита» различались в полтора раза (60 и 90 мкг/мл, соответственно). Антигрибные пептиды с примерно такими величинами МИК обычно считают умеренно активными [4]. В состав изучаемых нами антимикробных комплексов входит ряд АМР. Установлено, что смесь двух, и в ещё большей степени - трёх АМР склонна, прежде всего, к синергизму, в результате чего её антимикробная активность может возрасти во много раз [5]. В наших опытах примерно треть клеток дрожжеподобных грибов лизировалась за

3 часа их инкубации в жидкой среде при концентрациях в ней антимикробных комплексов 60 и 90 мкг/мл. МИКи последних, определённые нами ранее на синтетической среде Чапека, были в 2 - 4 раза меньше [8]. Известно, что величины МИК или МПК обычно отличаются в зависимости от состава питательных сред, это часто наблюдают при изучении антимикробной активности даже индивидуальных соединений. Мы же изучали антибиотическую активность сложных природных комплексов различающегося состава, для каждого из которых известны сезонные и другие вариации активностей [4, 6].

Рост мицелия *F. oxysporum* на сусло-агаре подавлялся при добавлении в лунки исследуемых растворов ССК и «Пиявита» в концентрации (200 - 250) мкг/мл, которую можно считать близкой к

МПК. Картина в СЭМ лизиса грибных гиф (через 5 ч инкубации) под влиянием растворов такой же концентрации представлена на рисунке.

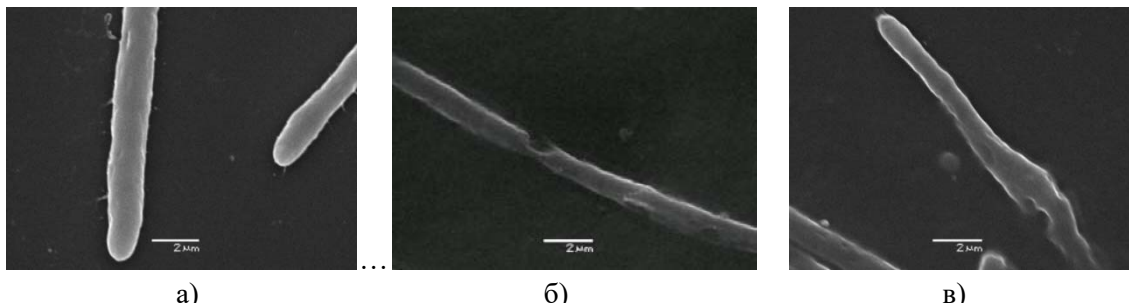


Рисунок 1. Вид в СЭМ гиф *F. oxysporum*, лизирующихся под влиянием растворов антимикробных комплексов.

Концентрация растворов 250 мкг/мл, время их действия 5 ч: а) – контроль, части гиф с интактной клеточной оболочкой, имеющей гладкую поверхность; б) - часть гифы, лизировавшаяся под влиянием раствора ССК: клеточная стенка истончена, с участками нарушенной целостности, видны её разрушения; в) - части гиф, лизирующихся под влиянием раствора водного экстракта «Пиявита»: участок разбухшей гифы с нарушенной поверхностью, сбоку от гифы видно вышедшее из неё внутриклеточное содержимое.

Следовательно, изучаемые нами растворы проявляют антибиотическую активность по отношению к молодым гифам гриба *F. oxysporum*, которая приводит к лизису их части (примерно трети) через 5 час. Картина лизиса гиф в СЭМ свидетельствует о нарушении их клеточных оболочек - разрежении, разрушении клеточных стенок, что обычно связано с нарушением проницаемости цитоплазматической мембраны.

**Выводы.** Таким образом, природные антимикробные комплексы - растворы ССК МП и лекарственного препарата «Пиявит», способны *in vitro* (даже в богатых восстановленными веществами питательных средах) оказывать антимикотическое действие по отношению к грибным патогенам *S. guillermondii* и *F. oxysporum*. Это даёт основание предполагать, что, после продолжения исследований, в том числе – и *in vivo*, ССК (который вводит в кровь пациентов МП при ГТ) и, с меньшей вероятностью, оральный лекарственный препарат «Пиявит», могут оказаться полезными в комплексном лечении ряда заболе-

ваний, обусловленных влиянием микроскопических грибов, особенно - на определённых этапах лечения пациентов с ослабленным иммунитетом, нарушениями функционирования сердечно-сосудистой системы, печени и почек, и рядом других заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кулько А.Б.. Спектр возбудителей глубоких микозов человека. Онкогематология. 2012. 3. с. 55-61.
2. Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. Cold Spring Harb Perspect. Med. 2014. 10; 5(7): a019752.
3. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н. Нежелательные явления, наблюдаемые при использовании современных противогрибковых препаратов в лечении инвазивных микозов. Онкогематология. 2013. 2. С. 47-59.
4. Lum K.Y., Tay S.T., Le C.F... [et al.]. Activity of Novel Synthetic Peptides against *Candida albicans*. Scientific Reports. 2015. 5. Article number: 9657.
5. Yu G., Baeder D.Y., Regoes R.R., Rolff J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 2016. 4. 60(3): 1717 - 1724.
6. Баскова И.П. Научные основы гирудотерапии. Гуморальное звено. 2015. Тула. «Аквариус». 228 с.
7. Го Даньян, Павлова И.Б. Сравнение антибиотического действия секрета слюнных клеток медицинской пиявки и фермента дестабилазы-лизоцима, входящего в состав этого секрета. Медицинский академический журнал. 2012. Т.12. № 5. с. 485-486.
8. Павлова И.Б., Юдина Т.Г., Баскова И.П., Го Даньян, Чен Лейли, Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Изучение перспектив использования секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* и препарата «Пиявит» как антимикробных комплексов, не вызывающих резистентности у микроорганизмов. Современные проблемы науки и образования. 2015. №2. URL: www.science-education.ru/131-23637 (дата обращения: 03.12.2015).
9. Whitaker I., Maltz M., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the Digestive Tract Microbiota of *Hirudo orientalis* (Medicinal Leech) and Antibiotic Resistance Profile. Plastic and Reconstructive Surgery. 2014. 133(3):408e-18e.

10. Jung S., Sönnichsen F.D., Hung C.W. ..., Tasiemski A.,... Leippe M. [et al.]. Macin Family of Antimicrobial Proteins Combines Antimicrobial and Nerve Repair Activities. J Biol Chem. 2012. 287(17): 14246–14258.

11. Nucci M. and Anaissie E. Fusarium Infections in Immunocompromised Patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007. 20(4): 695–704.

## SENSITIVITY TO NATURAL ANTIMICROBIAL COMPLEXES OF MYCOSES INCITANTS – REPRESENTATIVES OF GG. CANDIDA AND FUSARIUM

I.B.Pavlova<sup>1</sup>, Guo Danyan<sup>2</sup>, L.C.Chen<sup>3</sup>, T.G. Yudina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FGBOU VPO "Lomonosov Moscow State University", Moscow, Russia

<sup>2</sup>Chinese state scientific research institute of the food and fermentativny industry, Beijing, China

<sup>3</sup>Shandong academy of agricultural sciences of China, Jinan, China

**Annotation.** Various fungal infections and diseases associated with bacterial and fungal pathogens, are very dangerous because of the rapidly spreading to the sustainability of their pathogens used drugs, immune deficiency. Recently demonstrated that only the combination of several antimicrobial proteins and / or peptides (AMP) do not causes the emergence of resistance in pathogens. In connection with this expanded study of antimicrobial activity of natural, evolutionarily balanced complexes containing AMP. A special place among these complexes take the secret of the salivary cells of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. In vitro we established that young fungal hyphae *Fusarium oxysporum*, and the yeast *Candida guilliermondii* are sensitive to antimicrobic effect of solutions of a secret of salivary cages of a medical blood-sucker of *H. medicinalis*, and also water extract from the preparation "Piyavit" prepared on the basis of medical leeches, allowed for clinical use. To study the antifungal activity of solutions used traditional microbiological methods, as well as electron microscopy. The assumption is made about the likely prospects (after further experiments, including in vivo) the use of the studied natural antimicrobial complexes that do not cause resistance in microorganisms, in complex treatment of fungal infections in immunocompromised patients, with disruption of the functioning of the cardiovascular system, liver function disorders, kidney disease, and a number of other diseases - instead of traditionally used antibiotics and some other drugs.

**Key words.** the secret of the salivary cells of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*; antimicrobial proteins and peptides (AMP); integrated natural antifungals - antifungals.

### REFERENCES

1. Kulko A.B. Pathogens spectrum of deep human mycosis. Oncohematology. 2012. 3. 55-61.

2. Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. Cold Spring Harb Perspect. Med. 2014. 10; 5(7): a019752.

3. Dmitrieva N.V., Petukhova I.N. Adverse events of modern antifungal drugs during treatment of invasive fungal infections. Oncohematology. 2013. 2. C. 47-59.

4. Lum K.Y., Tay S.T., Le C.F., Sabri N.H., Velayuthan R.D., Hassan H., Sekaran S.D. Activity of Novel Synthetic Peptides against *Candida albicans*. Scientific Reports. 2015. 5. Article number: 9657.

5. Yu G., Baeder D.Y., Regoes R.R., Rolff J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 2016. 4. 60(3): 1717 - 1724.

6. Baskova I.P. Hirudotherapy scientific basements. Humoral link. (Nauchnye osnovy girudoterapii. Gumoral'noe zveno). 2015. Tula. «Akvarius». 228 p. (In Russian).

7. Guo Danyan, Pavlova I.B. Comparison of the antibiotic action of the salivary secretions of the medicinal leech cells and enzyme destabilase-lysozyme, which is part of the secret.

Medicinskij akademicheskij zhurnal (Medical academic journal, St. Petersburg) (In Russian). 2012. 12. № 5. p. 485-486.

8. Pavlova I.B., Yudina T.G., Baskova I.P., Guo Danyan, Chen Leyli, Feoktistova H.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin C.H. Studying of prospects of use of the secret of salivary cages of the medical bloodsucker of *Hirudo medicinalis* and preparation «Piyavit» as the antimicrobic complexes which aren t causing resistance in microorganisms. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya. 2015. №2. URL: www.science-education.ru/131-23637 (Accessed 3th December 2015).

9. Whitaker I., Maltz M., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the Digestive Tract Microbiota of *Hirudo orientalis* (Medicinal Leech) and Antibiotic Resistance Profile. Plastic and Reconstructive Surgery. 2014. 133(3):408e-18e.

10. Jung S., Sönnichsen F.D., Hung C.W., Tholey A., Boidin-Wichlacz C., Haeusgen W., Gelhaus C., Desel C., Podschun R., Waetzig V., Tasiemski A., Leippe M., Grötzinger J. Macin Family of Antimicrobial Proteins Combines Antimicrobial and Nerve Repair Activities. J Biol. Chem. 2012. 287(17): 14246–14258.

11. Nucci M. and Anaissie E. Fusarium Infections in Immunocompromised Patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007. 20(4): 695–704.