



Бакланова О.В.¹, Гололобова Т.В.², Федорова Л.С.², Лопатина О.А.¹,
Бидевкина М.В.², Гущина Е.А.¹, Суетина И.А.¹, Лисицын Ф.В.¹, Ковалевский С.А.³,
Далидчик Ф.И.³, Мезенцева М.В.¹

Токсикологическая характеристика и бактерицидные свойства гетерополикислот Кеггина

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, Россия;

²ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 117246, Москва, Россия;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семёнова» Российской академии наук, 119334, Москва, Россия

Введение. В современных условиях эффективность дезинфекционных мероприятий часто осложняется быстрым развитием резистентности микроорганизмов к известным дезинфицирующим средствам (ДС), поэтому необходим постоянный поиск новых, эффективных, безопасных ДС и их композиций. Полиоксометаллаты (ПОМ), особенно гетерополикислоты Кеггина (ГПК), являются перспективным классом неорганических соединений с широкой биологической активностью, включая противовирусную и антибактериальную. В связи с этим вопросы изучения токсичности и бактерицидной активности ГПК для создания новых ДС или оптимизации воздействия известных в сочетании с ГПК важны и актуальны. **Материалы и методы.** Образцы ГПК изучены по показателю цитотоксичности (IC₅₀) на трёх линиях клеток с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ-теста) с применением МТТ-реактива 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид. Острую токсичность на белых мышах при введении в желудок и внутрибрюшинно изучали в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. Бактерицидную активность ГПК и их сочетаний с перекисью водорода определяли в отношении тест-микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* суспензионным методом, результаты дополняли электронно-микроскопическим исследованием.

Результаты. Ванадийсодержащие структуры ГПК обладали более высокой цитотоксичностью. По показателю острой токсичности все исследованные ГПК соответствовали классу опасности 3. Выявлена бактерицидная активность ГПК и их комбинаций с перекисью водорода. Введение двух атомов ванадия в структуру повышало бактерицидную активность. Электронно-микроскопическое исследование показало более выраженные морфологические изменения в ультраструктуре *E. coli* под действием комбинации ГПК с перекисью водорода. Высказано предположение, что бактерицидная активность связана с проникновением ГПК через повреждённую мембрану пориновых каналов бактериальной клетки. Дано объяснение других возможных механизмов действия ГПК.

Ограничения. Исследование ограничено изучением токсикологических характеристик и бактерицидных свойств ГПК, их комбинаций с перекисью водорода. Ограниченное количество образцов ГПК и ДС связано со сложностью биологических экспериментов. Выбор трёх клеточных линий определён тремя различными источниками их происхождения. Суспензионный метод оценки антимикробной активности веществ выполнен по соответствующему ГОСТ, использованы тест-культуры *S. aureus* и *E. coli*, другие патогены не рассматривались. Опыты *in vivo* проведены в соответствии с директивными документами по охране экспериментальных животных, а их ограниченное количество связано со стоимостью животных и с современными этическими взглядами на опыты *in vivo*.

Заключение. Показана перспективность изучения ГПК и их комбинирования с ДС различного механизма действия для усиления дезинфицирующего эффекта и снижения риска развития устойчивости микроорганизмов к ДС.

Ключевые слова: дезинфицирующие средства; гетерополикислоты Кеггина; токсичность; бактерицидная активность

Соблюдение этических стандартов: Комитет по биомедицинской этике ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора утвердил программу проведения испытаний гетерополикислот Кеггина на лабораторных животных. Протокол заседания № 3 от 10.06.2020 г.

Для цитирования: Бакланова О.В., Гололобова Т.В., Федорова Л.С., Лопатина О.А., Бидевкина М.В., Гущина Е.А., Суетина И.А., Лисицын Ф.В., Ковалевский С.А., Далидчик Ф.И., Мезенцева М.В. Токсикологическая характеристика и бактерицидные свойства гетерополикислот Кеггина. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(1): 87-94. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-87-94>

Для корреспонденции: Бакланова Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. культур тканей ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: ov_baklanova@mail.ru

Участие авторов: Бакланова О.В. — концепция исследования, сбор и обработка данных, написание текста, ответственность за целостность всех частей статьи; Гололобова Т.В. — редактирование; Федорова Л.С. — ответственность за микробиологическое исследование, утверждение окончательного варианта статьи; Лопатина О.А. — концепция исследования, сбор и обработка материала, написание текста; Бидевкина М.В. — ответственность за токсикологическое исследование; Гущина Е.А. — ответственность за электронно-микроскопическое исследование; Суетина И.А. — выполнение цитотоксического исследования; Лисицын Ф.В. — подготовка фотоматериалов; Ковалевский С.А. — дизайн исследования, выбор образцов ГПК; Далидчик Ф.И. — концепция исследования, редактирование; Мезенцева М.В. — утверждение окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Фундаментальные основы создания наноструктурированных систем нового поколения с уникальными эксплуатационными электрическими и магнитными свойствами» № 0082-2018-0003 (регистрационный номер АААА-А18-118012390045-2).

Поступила: 01.09.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликована: 09.02.2022

Olga V. Baklanova¹, Tatyana V. Gololobova², Lyudmila S. Fedorova², Olga A. Lopatina¹, Marina V. Bidevkina², Elena A. Gushchina¹, Irina A. Suetina¹, Fedor V. Lisitsyn¹, Sergey A. Kovalevskiy³, Fedor I. Dalidchik³, Marina V. Mezentseva¹

Toxicological characteristic and bactericidal properties of Keggin-type heteropolyacids

¹N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation;

²Research Disinfectology Institute, Moscow, 117246, Russian Federation;

³N.N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow, 119334, Russian Federation

Introduction. In modern reality the effectiveness of disinfection measures is often complicated by rapid development of microbial resistance to known disinfectants, therefore a constant search for new effective, safe disinfectants and compositions is necessary. Polyoxometallates (POMs), especially Keggin's heteropolyacids (HPAs), are a promising class of inorganic compounds with a broad biological activity, including antiviral and antibacterial ones. So the research of HPAs toxicity and bactericidal activity for the creation of new disinfectants or optimization of known disinfectants by combining with HPAs are essential and actual.

Materials and methods. HPAs samples $H_3PW_{12}O_{40}$, $H_3PMo_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$, $H_4PMo_{11}VO_{40}$, $H_3PMo_{10}V_2O_{40}$, $H_4PW_{11}VO_{40}$ were evaluated by the cytotoxicity index (IC_{50}) in three cell lines by the MTT method using MTT-reagent 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide. HPAs acute toxicity in white mice (administration into the stomach and intraperitoneally) was tested in accordance with GOST 12.1.007-76. Bactericidal activity of HPAs and compositions with hydrogen peroxide was determined against test microorganisms *S. aureus* and *E. coli* by the suspension method. The results were supplemented by electron microscopic examination.

Results. Vanadium-containing HPAs structures had higher cytotoxicity. All HPAs corresponded to hazard class III in terms of acute toxicity. Bactericidal activity of HPAs and HPAs combinations with hydrogen peroxide was revealed. The incorporation of two vanadium atoms into HPAs structure increased the bactericidal activity. Electron microscopic examination showed more pronounced morphological changes in the ultrastructure of *E. coli* treated with HPAs / hydrogen peroxide combinations. Mechanism of the bactericidal activity may be associated with HPAs penetration through a damaged membrane of porin channels of bacterial cells. Explanations are also given for another possible mechanism of HPAs action.

Limitations. The study is limited to researching toxicological characteristics and bactericidal properties of HPAs, their combinations with hydrogen peroxide. The limited number of HPAs and disinfectants samples is associated with the complexity of the biological experiments. The choice of three cell lines is determined by three different sources of their origin. The suspension method for assessing the antimicrobial activity of substances was performed under the relevant GOST. Test cultures of *S. aureus* and *E. coli* were used, other pathogens were not considered. The experiments in vivo were carried out under guidelines for the protection of experimental animals, and their limited number is due to the cost of animals and current ethical views on experiments in vivo.

Conclusion. It has been shown that prospects of both HPAs research and combining HPAs with disinfectants having a different mechanism of action in order to enhance a disinfecting effect and reduce the risk of developing microbial resistance to disinfectants.

Keywords: disinfectants; Keggin-type heteropolyacids; toxicity; bactericidal activity

Compliance with ethical standards. The Biomedical Ethics Committee of the Research Institute of Disinfectology of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing approved the program for testing Keggin's heteropolyacids on laboratory animals. Protocol No. 3 dated 06/10/2020.

For citation: Baklanova O.V., Gololobova T.V., Fedorova L.S., Lopatina O.A., Bidevkina M.V., Gushchina E.A., Suetina I.A., Lisitsyn F.V., Kovalevskiy S.A., Dalidchik F.I., Mezentseva M.V. Toxicological characteristic and bactericidal properties of Keggin-type heteropolyacids. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(1): 87-94. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-87-94> (In Russian)

For correspondence: Olga V. Baklanova, MD, PhD, head researcher in tissue culture laboratory of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: ov_baklanova@mail.ru

Contribution: Baklanova O.V. – research concept, data collection and processing, text writing, responsibility for the integrity of all parts of the article; Gololobova T.V. – editing; Fedorova L.S. – responsibility for microbiological research, approval of the final version of the article; Lopatina O.A. – research concept, collection and processing of material, text writing; Bidevkina M.V. – responsibility for toxicological research; Gushchina E.A. – responsibility for electron microscopic examination; Suetina A.A. – performing cytotoxic tests; Lisitsyn F.V. – preparation of photographic materials; Kovalevskiy S.A. – research design, selection of HPA samples; Dalidchik F.I. – research concept, editing; Mezentseva M.V. – approval of the final version of the article.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The work was carried out within the framework of the state task on the topic "Fundamental foundations for the creation of nanostructured systems of a new generation with unique operational electrical and magnetic properties" No. 0082-2018-0003 (registration number AAAA-A18-118012390045-2).

Received: September 1, 2021 / Accepted: November 25, 2021 / Published: February 09, 2022

Введение

В современном мире распространение инфекционных заболеваний рассматривается как глобальная медико-социальная проблема. В комплексе мер неспецифической профилактики инфекционных заболеваний важнейшее место занимают дезинфекционные мероприятия, эффективность которых определяется различными факторами, одним из которых является разнообразие и свойства условно-патогенной микрофлоры. Снижение в ряде случаев эффективности профилактических, в том числе дезинфекционных меро-

приятий в медицинских организациях напрямую зависит от спектра условно патогенной микрофлоры, селекции внутрибольничных патогенных и условно-патогенных штаммов, у которых всё чаще выявляется резистентность к некоторым группам дезинфицирующих и антисептических средств, снижающая эффективность профилактических мер. В связи с этим проблема поиска новых, эффективных, экологически безопасных дезинфицирующих средств (ДС) и их композиций является актуальной и значимой [1–4].

Полиоксометаллаты (ПОМ) являются большим, перспективным, быстро развивающимся классом неоргани-

ческих соединений с выраженной биологической активностью [5]. Это полиядерные комплексы, основу которых представляют атомы переходных металлов, неметаллов (кремния, фосфора) и кислорода, характеризующиеся большим разнообразием структурных типов и свойств. К ним относятся гетерополиоксиды (ГПК) класса Кеггина, содержащие гетероанион $[X_{12}O_{40}]^{n-}$, где М обычно молибден, вольфрам, ванадий. Благодаря разнообразию строения, химических свойств и биологической активности, ГПК нашли применение в различных областях химии, биологии, медицины. В литературе имеются сведения о противовирусном эффекте различных по составу ПОМ, известно противоопухолевое действие молибден- и ванадийсодержащих ГПК [6–12]. Ведётся скрининг новых, активных в отношении бактерий и вирусов модификаций ПОМ. Большинство изученных ПОМ не обладают высокой антибактериальной активностью в фармакологически применимых дозах, но они повышают активность известных антибиотиков. Так, совместное с бета-лактамами антибиотиками применение ПОМ, в структуру которых включён гетероанион $[PW_{11}O_{39}]^{n-}$, способствует повышению антибактериальной активности бета-лактамов антибиотиков против метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* в опытах *in vitro*. Описана фотокаталитическая инактивация *E. coli* под действием ГПК класса Кеггина [13].

В настоящей работе представлены результаты изучения токсических свойств ГПК класса Кеггина, а также бактерицидной активности в отношении основных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий *S. aureus* и *E. coli* как ГПК, так и их комбинаций с известным дезинфицирующим средством ДС – перекисью водорода.

Материалы и методы

Химические образцы ГПК представлены Институтом химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН в виде твёрдых субстанций, из них четыре образца ГПК – $H_3PW_{12}O_{40}$, $H_3PMo_{12}O_{40}$, $H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$ производства Biochem (Франция) и три образца ГПК – $H_4PMo_{11}VO_{40}$, $H_3PMo_{10}V_2O_{40}$, $H_2PW_{11}VO_{40}$, синтезированные в Институте общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси.

Культуры клеток – фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ), клетки собачьей почки Мадин–Дарби (МДСК) и клетки карциномы лёгких (А-549) – взяты из Коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Все клеточные линии культивировали на среде Игла MEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки крови при температуре 37 °С в атмосфере 5%-го CO_2 .

Для исследования токсического действия на клеточные культуры применяли водные растворы ГПК в сантимолярной концентрации.

Цитотоксичность ГПК определяли, используя метилтразолиевый тест (МТТ-тест) по общепринятой методике. Через 48 ч после культивирования клеток с разведениями ГПК на приборе ImmunoChem-2100 Microplate Reader при длине волны 545 нм измеряли оптическую плотность клеточной взвеси с образцами (а именно растворённого в ДМСО формазана), сравнивая её с этим же показателем контрольных клеток (без ГПК) и среды культивирования. Исследования проводили в трёх повторах. На основании этих данных вычисляли концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) [14].

Изучение острой токсичности ГПК проводили в соответствии с Директивой 2010/63ЕУ Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Опыты *in vivo* выполняли на белых беспородных мышах-самцах с массой тела 18–20 г, содержащихся на стандартном пищевом рационе. Применяли однократное введение в желудок или в брюшную полость методом одной точки, то есть каждую дозу в виде водного раствора вводили одному животному. Каждый образец вводили в желудок натошак с помощью

металлического зонда в дозах 100; 250; 500; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000 мг/кг. В течение 2 недель наблюдения оценивали клинические признаки отравления, регистрировали погибших животных. За DL_{50} принимали наименьшую дозу, вызвавшую летальный исход. Класс опасности определяли по классификации ГОСТ 12.1.007-76¹. Выживших животных выводили из эксперимента эвтаназией с использованием общего эфирного наркоза.

Внутрибрюшинно образцы вводили в дозах 100; 250; 500; 1000; 3000 мг/кг. Результаты оценивали по классификации токсичности веществ при введении под кожу и в брюшную полость по К.К. Сидорову².

Раздражающее действие двух образцов ГПК ($H_4SiW_{12}O_{40}$, $H_4SiMo_{12}O_{40}$) регистрировали при однократном внесении 50 мг вещества в конъюнктивальный мешок глаза кроликов породы советская шиншилла и наблюдении за состоянием животных в течение 2 недель. Контролем служил противоположный глаз животного. Раздражающее действие оценивали по выраженности гиперемии и отёку конъюнктивы, состоянию роговицы и радужной оболочки, количеству и качеству выделений из глаза.

Изучение бактерицидных свойств ГПК проводили в соответствии с ГОСТ Р 59072-2020 «Средства дезинфицирующие. Суспензионный метод определения антимикробной активности»³. В качестве тест-микроорганизмов использовали суспензии *S. aureus* (штамм АТСС 6538-Р) и *E. coli* (штамм АТСС 10536) в концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Образцы ГПК разводили до 1%-й концентрации, ванадийсодержащие аналоги изучали в концентрации 1 и 0,5%. Учёт роста тест-микроорганизмов проводили качественно (++ , – –). Контроль роста микроорганизмов без ГПК оценён как (++).

Для определения комбинированного бактерицидного действия ГПК и эталонного ДС были взяты 1%-е растворы фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот и 0,5%-й раствор перекиси водорода.

Влияние ГПК на ультраструктуру бактериальной клетки *E. coli* после 30-минутной экспозиции изучали на примере фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот (1%-е растворы), а также комбинации ГПК с перекисью водорода (0,5%-й раствор) с помощью электронной микроскопии ультратонких срезов. Использовали стандартную методику фиксации, обезвоживания, пропитки и заливки материала в эпоновую смесь с последующим его окрашиванием растворами уранилацетата и цитрата свинца. Полученные препараты исследовали в электронном микроскопе JEM 100ХС.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, Statistica. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$ [15, 16].

Результаты

Проведённые токсикологические исследования выявили цитотоксический эффект семи изученных образцов ГПК методом МТТ на клетках различного происхождения. Результаты изучения цитотоксичности по показателю IC_{50} представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что ГПК без ванадия в структуре обладали средней цитотоксичностью: IC_{50} колебались от 125 до 500 мкмоль/л. Выделялась высокая цитотоксичность ванадийсодержащих фосфорно-молибденовой и

¹ ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями № 1, 2).

² Методические указания МУ 1.2.1105-02 «Оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств» (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 10 февраля 2002 г.). Приложение 3.

³ ГОСТ Р 59072-2020 «Средства дезинфицирующие. Суспензионный метод определения антимикробной активности». М., 2020.

Таблица 1 / Table 1

**Цитотоксичность гетерополиоксидов (IC₅₀, мкмоль/л)
Cytotoxicity of HPAs (IC₅₀, μmol/l)**

ГПК HPAs	Фибробласты эмбриона человека Human embryo fibroblasts (HEF)	Клетки собачьей почки Мадин–Дарби Madin-Darby canine kidney MDCK cells	Клетки карциномы лёгких А-549 Lung carcinoma cells A-549
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	156	125	Не изучено / Not studied
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	310	125	Не изучено / Not studied
H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	500	250	250
H ₄ SiMo ₁₂ O ₄₀	310	250	156
H ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	10	25	80
H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	9.7	25	64
H ₄ PW ₁₁ VO ₄₀	19	33	35

Таблица 2 / Table 2

**Токсичность гетерополиоксидов в опытах *in vivo*
Toxicity of HPAs *in vivo* experiments**

ГПК HPAs	DL ₅₀ , мг/кг (mg/kg)		Раздражающее действие на слизистую оболочку глаза Irritating effect on the ocular mucous membrane
	введение в желудок intra-gastric administration	внутрибрюшинное введение intraperitoneal administration	
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	3000	1000	Не изучено / Not studied
H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	5000	250	Не раздражает / Not irritates
H ₄ SiMo ₁₂ O ₄₀	3000	1000	Слабо раздражает / Irritates lightly
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	2000	250	Не изучено / Not studied
H ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	2000	Не изучено / Not studied	Не изучено / Not studied
H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	1000	Не изучено / Not studied	Не изучено / Not studied

фосфорно-вольфрамовой кислот в отношении трёх линий клеток, особенно чувствительными были клетки эмбрионального происхождения: IC₅₀ находились в пределах от 9,7 до 19 мкмоль/л.

Изучена острая токсичность шести образцов ГПК при введении мышам в желудок и четырёх образцов – при введении их в брюшную полость, а также раздражающее действие двух веществ на глаза кроликов. Результаты изучения представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что при введении мышам в желудок образцов ГПК их DL₅₀ варьировали от 1000 до 5000 мг/кг, то есть по этому показателю все образцы ГПК относятся к умеренно опасным веществам (класс опасности 3 по ГОСТ 12.1.007). ГПК с двумя атомами ванадия в химической формуле (H₅PMo₁₀V₂O₄₀) характеризовалась наибольшей токсичностью: DL₅₀ составляла 1000 мг/кг. При внутрибрюшинном введении не содержащих ванадий ГПК показатели DL₅₀ колебались от 250 до 1000 мг/кг, что позволяет отнести эти соединения к малотоксичным веществам при данном способе введения.

Изучение раздражающего действия 2 образцов ГПК (кремниво-вольфрамовой и кремниво-молибденовой кислот) на глаз кролика выявило слабое раздражающее действие последнего образца.

Изучение бактерицидной активности образцов ГПК показало, что они обладают близкой активностью, проявляющейся в концентрации 0,5–1% (табл. 3). Прослеживается чёткая зависимость между концентрацией действующего вещества и временем воздействия, необходимым для гибели тест-микроорганизмов. Бактерицидная активность в отношении *E. coli* была незначительно выше, чем в отношении *S. aureus*, при этом обращает на себя внимание закономерно более высокий показатель бактерицидности ГПК с двумя атомами ванадия в опытах с *E. coli*.

С целью возможного повышения бактерицидного эффекта, снижения концентрации ДС и риска развития устойчивости патогенных микроорганизмов к ДС

Таблица 3 / Table 3

**Бактерицидная активность гетерополиоксидов
Bactericidal activity of HPAs**

ГПК HPAs	Концентрация, % Concentration, %	Время гибели бактерий, мин Time of bacteria death, minutes	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	1.0	30	Не изучено Not studied
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	1.0	40	Не изучено Not studied
H ₄ PMo ₁₁ VO ₄₀	0.5	60	60
	1.0	40	45
H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	0.5	15	120
	1.0	Не изучено Not studied	30
H ₄ PW ₁₁ VO ₄₀	0.5	120	120
	1.0	30	60

Таблица 4 / Table 4

**Комбинированное бактерицидное действие гетерополиоксидов и перекиси водорода
Combined bactericidal effect of HPAs and hydrogen peroxide**

Средство Agents	Концентрация, % Concentration, %	Время гибели <i>E. coli</i> , мин Time of <i>E. coli</i> death, minutes
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀	1	30
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	1	40
H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀ + H ₂ O ₂	1 + 0.5	30
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ + H ₂ O ₂	1 + 0.5	30
H ₂ O ₂	0.5	> 120

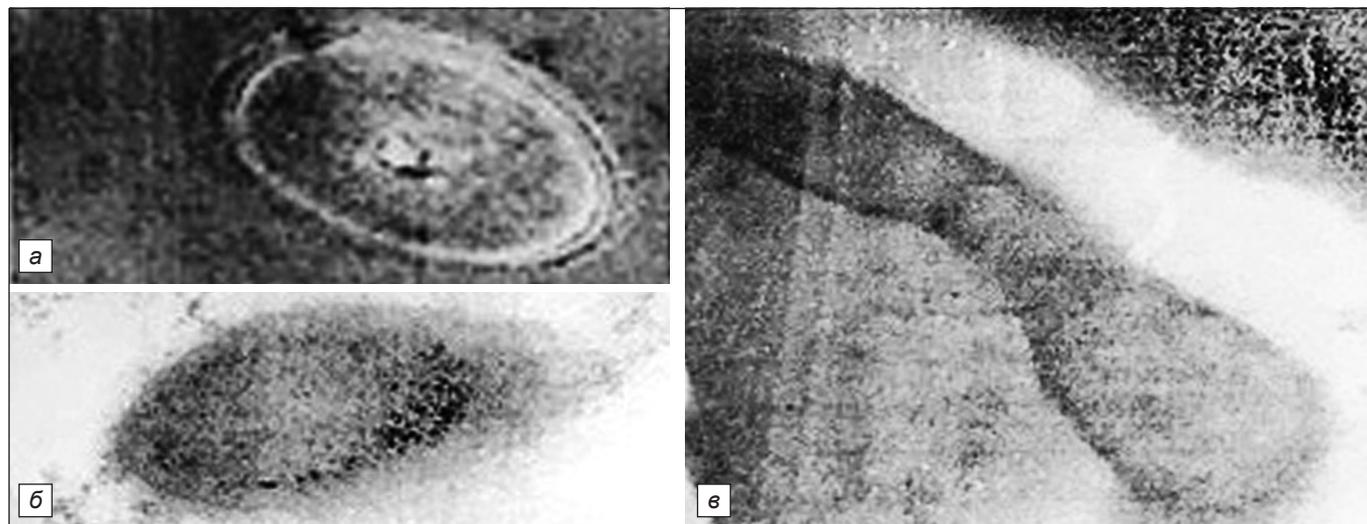


Рис. 1. Контроль клеток *E. coli*: а, б – клетки в стадии покоя; в – клетка в стадии деления.

Fig. 1. Control *E. coli*: а, б – cells at the resting phase; в – a cell in the process of dividing.

представляло интерес изучение комбинированного действия образцов ГПК с известными ДС. Для этого были выбраны фосфорно-вольфрамовая ГПК, фосфорно-молибденовая ГПК и четыре ДС (на основе гуанидина, третичного и четвертичного аминов, а также перекись водорода). Но из всех перечисленных ДС только перекись водорода образовывала с ГПК истинный водный раствор, поэтому для исследования была выбрана перекись водорода, отвечающая этому требованию и также представляющая интерес для этой цели.

Результаты изучения комбинированного бактерицидного действия ГПК и перекиси водорода представлены в табл. 4.

Показано, что добавление перекиси водорода в субактивной 0,5%-ной концентрации к 1%-м растворам фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой ГПК не повысило в значительной степени бактерицидную активности ГПК по сравнению с их монодействием. Вместе с тем электронно-микроскопическое исследование ультра-

тонких срезов *E. coli* после 30-минутной экспозиции бактериальной взвеси с ГПК выявило значительные морфологические изменения в структуре бактериальной клетки. На представленных фото в контроле (рис. 1, а–в) видны одиночные бактерии *E. coli*, а также делящиеся клетки с сохранённой структурой в виде микрокапсулы с трёхслойной клеточной мембраной, мелкогранулярной цитоплазмой и электронно-плотным нуклеоидом. Исследование клеток *E. coli*, обработанных фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой ГПК, а также их комбинациями с перекисью водорода, показало различное влияние на ультраструктуру бактериальной клетки.

При обработке клеток *E. coli* фосфорно-молибденовой кислотой в ультраструктуре клеточной стенки обнаружены нарушения микрокапсулы в виде появления мелкозернистого электронно-плотного слоя вокруг мембраны. На некоторых препаратах видны скопления агрегированных клеток, вызванные разрушением поверхностного слоя клеточных мембран (рис. 2, а, б).

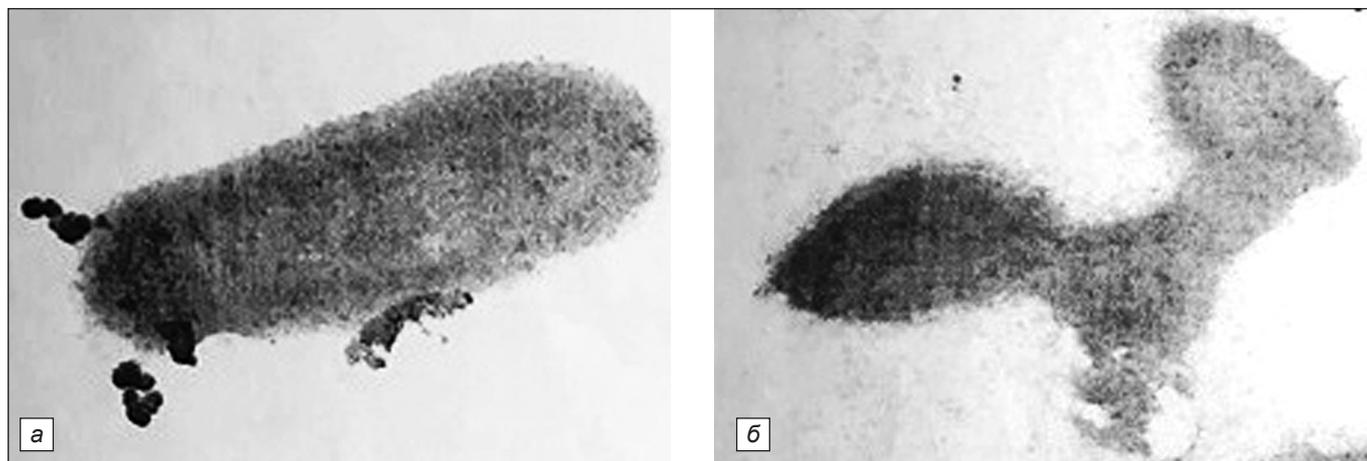


Рис. 2. Клетки *E. coli* после обработки $H_3PMo_{12}O_{40}$: а – уплотнённая трёхслойная мембрана *E. coli* с шероховатым наружным слоем; б – скопление клеток *E. coli* с утолщёнными слоями наружной мембраны.

Fig. 2. *E. coli* cells after treatment with $H_3PMo_{12}O_{40}$: а – compacted three-layer *E. coli* membrane with a rough outer layer; б – accumulation of *E. coli* cells with thickened outer membrane layers.

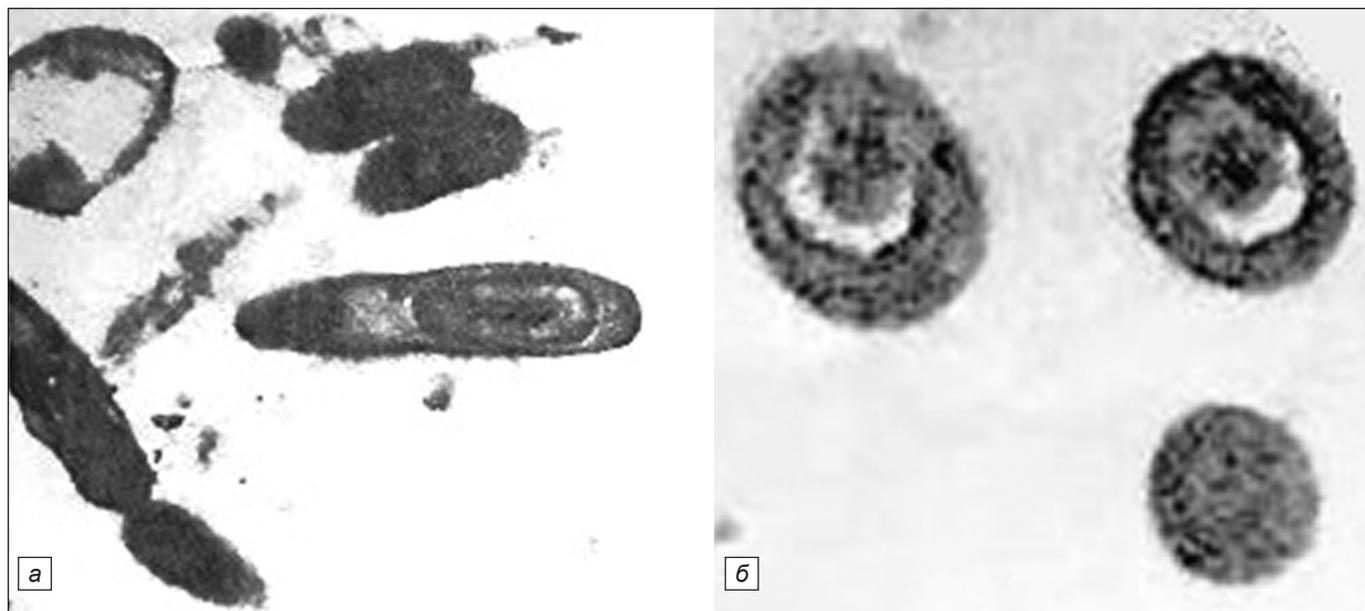


Рис. 3. Клетки *E. coli* после обработки $H_3PW_{12}O_{40}$: а – срез бактериальной клетки, нуклеоид с плотным содержимым, утолщенной клеточной мембраной и наружным шероховатым слоем; б – поперечный срез клетки с утолщенной клеточной стенкой, отходящей от цитоплазмы.

Fig. 3. *E. coli* cells after treatment with $H_3PW_{12}O_{40}$: а – a section of a bacterial cell, a nucleoid with a compact entocyte, a thickened cell membrane and a rough outer layer; б – transverse section of a cell with a thickened cell wall detaching from the cytoplasm.

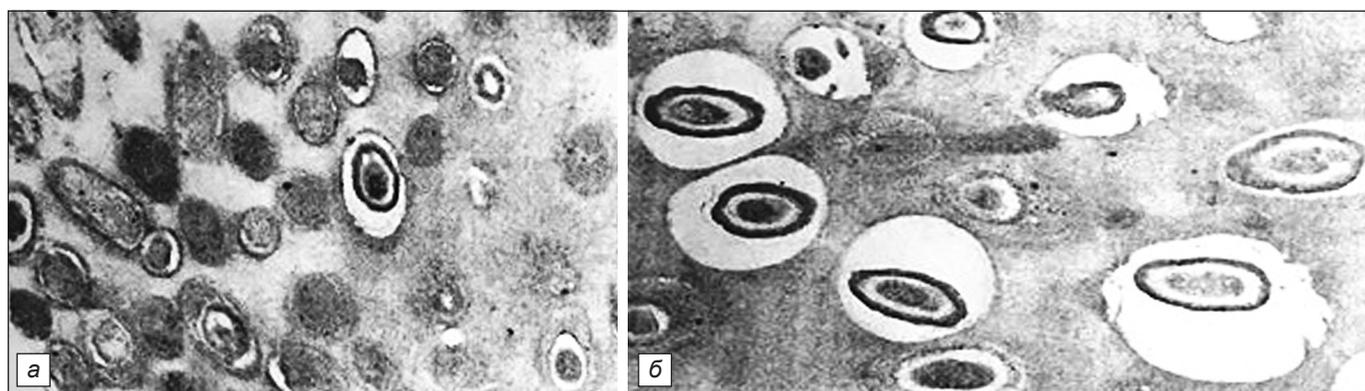


Рис. 4. Влияние совместного действия $H_3PW_{12}O_{40}$ и 0,5% H_2O_2 на клетки *E. coli*: а – начальная стадия деструкции клеток, отслойка цитоплазмы; б – сферулоподобные образования с электронно-прозрачными зонами.

Fig. 4. The influence of the cooperative effect of $H_3PW_{12}O_{40}$ and 0,5% H_2O_2 on *E. coli* cells: а – initial stage of cell destruction, cytoplasm detachment; б – spherula-like formations with electron-penetrating zones.

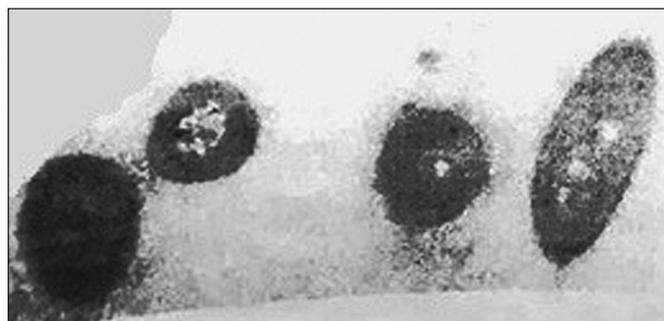


Рис. 5. Клетки *E. coli* с сохранившейся структурой после обработки 0,5% H_2O_2 .

Fig. 5. *E. coli* cells with preserved structure after treatment with 0.5% H_2O_2 .

Клетки кишечной палочки, обработанные фосфорно-вольфрамовой кислотой, были представлены главным образом клетками с изменённой структурой цитоплазмы, уплотнённой клеточной мембраной и видоизменённым нуклеоидом (рис. 3, а, б).

Изучение влияния комбинации образца ГПК $H_3PW_{12}O_{40}$ с перекисью водорода на ультраструктуру *E. coli* выявило наличие многочисленных бактериальных клеток на начальной стадии деструкции в виде отслойки цитоплазмы, уплотнения нуклеоида, образование сферулоподобных форм (рис.4, а, б).

Перекись водорода в концентрации 0,5% практически не вызвала морфологических изменений бактериальной клетки (рис. 5).

Таким образом, экспозиция ГПК с клетками кишечной палочки приводила к её ультраструктурным изменениям. При этом под действием фосфорно-вольфрамовой кислоты деструктивные изменения носили более выраженный характер, усиливающиеся в сочетании с перекисью водорода.

Обсуждение

Проведённые исследования показали, что изученные ГПК обладали цитотоксическим действием в отношении культуры клеток различного происхождения. Введение в молекулу атомов ванадия усиливало их цитотоксическое действие. Эта тенденция наблюдалась и в опытах *in vivo* на мышах по изучению токсичности ГПК при их пероральном введении: вещество с двумя атомами ванадия было наиболее токсично при этом способе введения. Однако в целом все образцы проявили умеренную токсичность при введении в желудок (класс опасности 3 по ГОСТ 12.1.007). Выявлена низкая токсичность ГПК без ванадия в структуре при внутривнутрибрюшинном введении.

Все образцы в максимальной концентрации (1%) характеризовались средней бактерицидной активностью, при этом введение в молекулу ГПК двух атомов ванадия способствовало повышению бактерицидной активности, что требует детального изучения.

Имеются сведения о том, что микроорганизмы, циркулирующие в медицинских организациях Москвы, в большей степени резистентны к катионным поверхностно-активным веществам (КПАВ): четвертичным аммониевым соединениям, триамину и др. При комбинировании их с кислородоактивными ДС резистентность микрофлоры снижалась почти в 10 раз по сравнению с обработкой только одними КПАВ и в 2 раза по сравнению с монодействием кислородоактивных ДС [4]. Опираясь в том числе и на эти данные, авторы предприняли попытку комбинирования ГПК (фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот) с кислородоактивными ДС (перекисью водорода) для воздействия этой комбинации на кишечную палочку.

Несмотря на то что в наших экспериментах не удалось повысить бактерицидную активность ГПК при добавлении к ним перекиси водорода, электронно-микроскопическое изучение ультраструктуры клеток *E. coli* показало перспективность данного направления исследования. Выявлены значительные морфологические изменения при воздействии как монообразцов ГПК, так и их комбинаций с перекисью водорода при практически полном отсутствии влияния перекиси водорода в субактивной дозе. Описанные морфологические

изменения (увеличение плотности наружной оболочки, отслоение мембраны от клеточной стенки, уплотнение нуклеоида) характерны для гипометаболических состояний бактериальной клетки [17–19, 23]. Нельзя исключить способность ГПК (с учётом химической структуры и наноразмеров) проходить через пориновые каналы, блокировать их и нарушать тем самым метаболизм бактериальной клетки. Кроме того, известен факт влияния pH среды на порообразующий белок НМ грамтрицательных бактерий [20–22]. Можно полагать, что образцы ГПК повышают кислотность среды, усиливая таким образом нарушение метаболизма кишечной палочки.

При комбинировании ГПК с перекисью водорода морфологические изменения были более выраженными: помимо перечисленных выше отмечено значительное увеличение периплазматического пространства, образование сферулоподобных форм *E. coli*, что свидетельствует об усилении действия ГПК в комбинации, приводящего к изменению жизнедеятельности бактерий.

В исследованиях по влиянию ПОМ на клеточные культуры высказано предположение об активности ГПК в отношении липидной оболочки клеток [24]. Возможно, одним из механизмов воздействия ГПК является повреждение липополисахаридной и липопротеидной части мембран грамтрицательных бактерий, приводящее к нарушению структуры микрокапсулы, проникновению ГПК через нарушенную мембрану и повреждению внутренних органелл.

Заключение

Проведённые исследования показали, что целесообразно изучить воздействие разных соотношений ГПК и перекиси водорода, особенно с учётом снижения в последнее время фоновой чувствительности микрофлоры к перекиси водорода и появления устойчивых вариантов бактерий к этому ДС. Следует ожидать, что влияние различных химических структур ГПК, их комбинирование с ДС другого механизма действия, изменение концентрации составляющих позволит усилить дезинфицирующий эффект, снизить риск развития устойчивости микроорганизмов к ДС и селекции внутрибольничных штаммов, что создаст условия для повышения эффективности профилактики инфекционных заболеваний.

Литература

(п.п. 5–9, 13, 21, 22 см. References)

1. Фёдорова Л.С. Проблемы резистентности микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях, к дезинфицирующим средствам. В кн.: *Инфекционные болезни – актуальные проблемы, лечение и профилактика. Материалы V межведомственной научно-практической конференции. Москва, 16–17 мая 2019 г.* М.: 2019.
2. Серов А.А., Гололобова Т.В., Фёдорова Л.С., Рулёва А.И., Евсеев А.А. Экспресс-методы определения чувствительности внутрибольничных штаммов микроорганизмов к дезинфицирующим средствам. В кн.: *Внутрибольничные инфекции в медицинских учреждениях различного профиля, риски, профилактика, лечение осложнений. Материалы XVII научно-практической конференции. Москва, 4 апреля 2019 г.* М.: 2019: 42–4.
3. Серов А.А., Шестопалов Н.В., Гололобова Т.В., Фёдорова Л.С., Храпунова И.А., Меркульева А.Д. Роль дезинфектологических исследований в организации комплекса профилактических мероприятий. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(3): 235–41. <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-3-235-241>
4. Шестопалов Н.В., Фёдорова Л.С., Серов А.А., Гололобова Т.В., Рулёва А.И., Сорокина Л.А. Проблемы мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам в медицинских организациях. *Дезинфекционное дело*. 2018; (2): 14–22.
10. Лопатина О.А., Исаева Е.А., Суетина И.А., Бакланова О.В., Руссу Л.И., Притчина Т.Н. и др. Действие гетерополикилот Кеггина на вирусы гриппа А. *Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век*. 2016; 8(2): 14–9.
11. Лопатина О.А., Исаева Е.А., Суетина И.А., Бакланова О.В., Притчина Т.Н., Руссу Л.И. и др. Противовирусная активность полиоксометаллатов и влияние их на экспрессию генов цитокинов. *Наноматериалы и наноструктуры – XXI век*. 2016; 7(1): 36–44.
12. Лопатина О.А., Бакланова О.В., Суетина И.А., Исаева Е.И., Гушина Е.А., Руссу Л.И. и др. Исследование токсического эффекта полиоксометаллатов со структурой Кеггина на культуры нормальных и онкогенных клеток. *Биологическая радиоэлектроника*. 2015; (3): 42–9.
14. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005: 649–50.
15. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая Школа; 1990.
16. StatSoft, Inc. *Электронный учебник по статистике*. М.: StatSoft; 2012. Доступно: <https://statsoft.ru/home/textbook/default.htm>
17. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Бабусенко Е.С., Козлова А.Н., Дужа М.В. и др. Образование покоящихся форм в автолизующихся суспензиях микроорганизмов. *Микробиология*. 1997; 66(1): 42–9.
18. Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Козлова А.Н., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Синтез аутоиндукторов анабиоза у неспорообразующих бактерий как механизм регуляции их активности в почве и подпочвенных осадочных породах. *Микробиология*. 2001; 70(5): 620–8.
19. Евтюгин В.Г., Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Кадилов М.К. Электронно-микроскопическое исследование морфологических изменений клеток кишечной палочки в условиях голодового стресса. *Вестник Казанского технологического университета*. 2011; (12): 167–71.
20. Новикова О.Д., Хоменко В.А., Вострикова О.П., Портнягина О.Ю., Сидорова О.В., Чистюлин Д.К. и др. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамтрицательных бактерий. Структура и свойства. *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. 2014; (1): 120–34.
23. Куриненко Б.М., Зинкевич Т., Крушельницкий А.Г., Пономарев В.Я., Яковлева Г.Ю. Особенности химического сдвига ядер 31Р фосфолипидов плазматической мембраны клеток *Escherichia coli*, индуцированного 2,4,6-тринитротолуолом. *Вестник Казанского технологического университета*. 2012; 15(23): 113–4.
24. Ковалевский С.А., Гулин А.А., Лопатина О.А., Васин А.А., Мезенцева М.В., Балашов Е.М. и др. Воздействие наноразмерных анионов кремний-молибденовой кислоты на плазматическую мембрану фибробластов эмбриона человека. *Российские нанотехнологии*. 2019; 14(9–10): 77–84. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-9-10-77-84>

References

- Fedorova L.S. Problems of resistance of microorganisms circulating in medical organizations to disinfectants. In: *Infectious Diseases – Actual Problems, Treatment and Prevention. Materials of the V Interdepartmental Scientific and Practical Conference. Moscow, May 16–17, 2019 [Infektsionnye bolezni – aktualnye problemy, lechenie i profilaktika. Materialy V mezhdromstvennoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Moskva, 16–17 maya 2019 g.]*. Moscow; 2019. (in Russian)
- Serov A.A., Gololobova T.V., Fedorova L.S., Ruleva A.I., Evseenko A.A. Methods for determining the sensitivity of nosocomial strains of microorganisms to disinfectants. Nosocomial infections in medical institutions of various profiles, risks, prevention, treatment of complications. *Materials of the XVII Scientific-practical conference. Moscow, April 4, 2019 [Materialy XVII nauchno-prakticheskoy konferentsii. Moskva, 4 aprelya 2019 g.]*. Moscow; 2019: 42–4. (in Russian)
- Serov A.A., Shestopalov N.V., Gololobova T.V., Fedorova L.S., Khrapunova I.A., Merkul'eva A.D. The role of disinfectological investigations in the management of the complex of preventive activities. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(3): 235–41. <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-3-235-241> (in Russian)
- Shestopalov N.V., Fedorova L.S., Serov A.A., Gololobova T.V., Ruleva A.I., Sorokina L.A. Problems of monitoring of microorganisms resistance to disinfection agents in healthcare institutions. *Dezinfektsionnoe delo*. 2018; (2): 14–22. (in Russian)
- Fournier M., Thouvenot R., Rocchiccioli-Deltcheff C. Catalysis by polyoxometalates. Part 1 – Supported polyoxoanions of the Keggin structure: spectroscopic study (IR, Raman, UV) of solutions used for impregnation. *J. Chem. Soc. Faraday Transactions*. 1991; 87(2): 349–56.
- Yanagie H., Ogata A., Mitsui S., Hisa T., Yamase T., Eriguchi M. Anticancer activity of polyoxomolybdate. *Biomed. Pharmacother*. 2006; 60(7): 349–52. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.06.018>
- Rhule J.T., Hill C.L., Judd D.A., Schinazi R.F. Polyoxometalates in medicine. *Chem. Rev*. 1998; 98(1): 327–58. <https://doi.org/10.1021/cr960396q>
- Shigeta S., Mori S., Yamase T., Yamamoto N., Yamamoto N. Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomed. Pharmacother*. 2006; 60(5): 211–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.009>
- Hosseini S.M., Amini E., Tavassoti Kheiri M., Mehrbod P., Shahidi M., Zabihi E. Anti-influenza activity of a novel polyoxometalate derivative (POM-4960). *Int. J. Mol. Cell Med*. 2012; 1(1): 21–9.
- Lopatina O.A., Isaeva E.A., Suetina I.A., Baklanova O.V., Russu L.I., Pritchina T.N., et al. Influence of heteropoly acids with Keggin structure on influenza A viruses. *Nanotekhnologii: razrabotka, primeneniye – XXI vek*. 2016; 8(2): 14–9. (in Russian)
- Lopatina O.A., Isaeva E.A., Suetina I.A., Baklanova O.V., Pritchina T.N., Russu L.I., et al. Polyoxometalates antiviral activity and their impact on cytokine's genes expression. *Nanomaterialy i nanostruktury – XXI vek*. 2016; 7(1): 36–44. (in Russian)
- Lopatina O.A., Baklanova O.V., Suetina I.A., Isaeva E.I., Gushchina E.A., Russu L.V., et al. Toxic effect of polyoxometalates (POMs) with Keggin's structure on normal and tumor cells culture. *Biologicheskaya radioelektronika*. 2015; (3): 42–9. (in Russian)
- Bijelic A., Aureliano M., Rempel A. The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chem. Commun. (Camb)*. 2018; 54(10): 1153–69. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>
- Khavriev R.U. *Manual for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005: 649–50. (in Russian)
- Lakin G.F. *Biometrics [Biometriya]*. Moscow: Vysshaya Shkola; 1990. (in Russian)
- StatSoft, Inc. *Electronic textbook on statistics*. Moscow: StatSoft; 2012. Available at: <https://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm> (in Russian)
- Mulyukin A.L., Lusta K.A., Gryaznova M.N., Babusenko E.S., Kozlova A.N., Duzha M.V., et al. Formation of dormant forms in autolyzing suspensions of microorganisms. *Mikrobiologiya*. 1997; 66(1): 42–9. (in Russian)
- Mulyukin A.L., Demkina E.V., Kozlova A.N., Soina V.S., El-Registan G.I. Synthesis of anabiosis autoinducers in non-spore-forming bacteria as a mechanism for regulating activity in soil and subsoil sedimentary rocks. *Mikrobiologiya*. 2001; 70(5): 620–8. (in Russian)
- Evtuyin V.G., Margulis A.B., Il'inskaya O.N., Kadirov M.K. Electron microscopic study of morphological changes in *E. coli* cells under conditions of hunger stress. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2011; (12): 167–71. (in Russian)
- Novikova O.D., Khomenko V.A., Vostrikova O.P., Portnyagina O.Yu., Sidorova O.V., Chistyulin D.K., et al. Outer membrane pore-forming proteins of some gram-negative bacteria. Structure and function. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk*. 2014; (1): 120–34. (in Russian)
- Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Pauptit R.A., et al. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*. 1992; 358(6389): 727–33. <https://doi.org/10.1038/358727a0>
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2003; 67(4): 593–656. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>
- Kurinenko B.M., Zinkevich T., Krushel'nitskiy A.G., Ponomarev V.Ya., Yakovleva G.Yu. Features of the chemical shift of ³¹P nuclei of phospholipids of the plasma membrane of *Escherichia coli* cells, induced by 2,4,6-trinitrotoluene. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2012; 15(23): 113–4. (in Russian)
- Kovalevskiy S.A., Gulin A.A., Lopatina O.A., Vasin A.A., Mezentseva M.V., Balashov E.M., et al. The effect of nanosized silicon molybdate anions on the plasma membrane of human fetal fibroblasts. *Rossiyskie nanotekhnologii*. 2019; 14(9–10): 481–8. <https://doi.org/10.1134/S1995078019050082>