

**КОМПЛЕКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОГО ДЕЙСТВИЯ ЭМУЛЬСИИ
ЭВГЕНОЛА В ПОЛИСОРБАТЕ-80
НА ЭТАЛОННЫЙ ШТАММ *Candida albicans* ATCC 885-653**

Федорченко В. И., Полянская В. П., Зачепило С. В., Боброва Н. А., Лобань Г. А.

*Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава, Украина*

Актуальность

Грибы рода *Candida*, в частности *Candida albicans*, относятся к группе возбудителей оппортунистических инфекций [1], следовательно, не являются высоко патогенными. Однако, особенности эпидемиологии кандидоза заключаются в том, что данный микроорганизм может присутствовать в составе резидентной микрофлоры здоровых людей. Кандидоз, как проявление дисбиоза, возникает на фоне снижения колонизационной резистентности слизистых оболочек и кожи в силу тех или иных причин [15,16]. Этому может способствовать широкое применение антибактериальных средств (в первую очередь - антибиотиков), особенно самостоятельное и бесконтрольное их применение, прием кортикостероидных гормонов, цитостатиков, контрацептивов.

Проблема профилактики и лечения данной оппортунистической инфекции является чрезвычайно актуальной для широкого круга лиц. Склонны к возникновению кандидоза лица с преходящим иммунодефицитом, который возникает после перенесенного основного заболевания. Актуальна эта проблема и для лиц с постоянным нарушением иммунного статуса, в том числе - для ВИЧ-инфицированных и, в частности, для лиц со СПИДом. Влияют также возрастные особенности функционирования иммунной системы. Это касается также новорожденных детей и лиц пожилого возраста.

Разработан ряд эффективных противогрибковых препаратов для системного, а также для местного применения. Однако, недостатком химических препаратов часто является определенная степень побочных действий, особенно в условиях системного применения.

Разработка противогрибковых препаратов на основе растительного сырья также может быть полезной, особенно это касается препаратов для местного применения. Существует большое количество растений и экстрактов из них, для которых характерна антимикробная активность [5]. Одним из веществ растительного происхождения со значительным антимикробным действием является эвгенол [9,12]. Для него характерны антисептические, противовоспалительные и обезболивающие свойства. Он широко применяется в стоматологической практике как один из компонентов цинкоксидных паст

для временного и постоянного пломбирования зубов[18]. В то же время, эвгенол не получил широкого применения в качестве антисептика для кожного применения, а также для обработки слизистых оболочек.

Исследование антимикробной активности эвгенола проводилось в виде растворов этого вещества в спирте и диметилсульфоксиде [10,11]. Представляет интерес создание эмульсии эвгенола, с использованием других веществ, обладающих выраженными эмульгирующими свойствами, побочное действие которых является минимальным. В литературе не освещены вопросы о возможности получения эмульсии эвгенола в полисорбате-80, который характеризуется эмульгирующими и солюбилизующими свойствами, легко разлагается во внешней среде.

Указанные свойства полисорбата-80 могут оказаться полезными не только в роли эмульгатора эвгенола. Данное вещество, вероятно, также может способствовать дезинтеграции микроорганизмов как между собой, так и со структурами кожных покровов и слизистых оболочек. Воздействуя на липидные структуры оболочек микроорганизмов, полисорбат-80, вероятно, может являться причиной нарушения процессов адгезии и колонизации микроорганизмов

Целью данного исследования было комплексное изучение действия эвгенола, эмульгированного в полисорбате-80 на культуру *Candida albicans* ATCC 885-653 путем определения минимальной ингибирующей, микоцидной и микостатической концентраций, а также показателей интенсивности размножения грибов в постмикостатических концентрациях эвгенола.

Материалы и методы

В качестве основного исследуемого вещества использовали эвгенол (производитель ООО «Латус», Украина). Для получения эмульсии применили эмульгатор полисорбат-80, способный обеспечить качественное распределение действующего вещества в эмульсии. Эвгенол первично эмульговали в полисорбате-80 в соотношении 1:1. Следовательно, в рабочем растворе концентрации эвгенола и полисорбата-80 были одинаковыми и равнялись 50 объём.%. Количественное определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) эвгенола для культуры грибов исследовали с помощью метода последовательных макророзведений [3,7] в жидкой среде Сабуро в диапазоне от 0,1 до 0,00313 объём.%. Указанный диапазон разведений был выбран на основании данных литературы [8,10] об уровне противокандидозной активности эвгенола в различных растворителях, а также собственных предварительных исследований эмульсии препарата в полисорбате-80.

В работе был использован эталонный штамм *C. albicans* ATCC 885-653, полученный из ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громашевского АМН Украины» (г.Киев). Инокулом готовили путем получения суспензии с 5 типичных колоний суточной культуры *Candida albicans* ATCC 885-653 в жидкой среде Сабуро с использованием стандарта 0,5 Мак-Фарланда [3]. К 1 мл эмульсии эвгенола с концентрацией в диапазоне от 0,1 до 0,00313 объём.% добавляли по 100 мкл культуры микроорганизмов и инкубировали пробы в течение 2 суток.

Минимальная ингибирующая концентрация препарата (МИК) определялось по признаку отсутствия видимого роста грибов в жидкой питательной среде. В опытной серии содержались все компоненты в соответствующих концентрациях. В контроль эмульгатора эвгенол не вносился. Контроли культуры содержали: в опытной серии – питательную среду, полисорбат-80 (ПС-80) и культуру; в контроле эмульгатора – питательную среду и культуру.

Для определения фунгицидного и фунгистатического действия препарата делали пересев содержимого пробирок, в которых видимые признаки роста микроорганизмов отсутствовали, на плотную среду Сабуро.

Количественная оценка влияния эвгенола на клетки грибов проводилась путем определения количества колониеобразующих единиц в 1мл инокулюма (КОЕ/мл). Для этого делали пересев из опытных и контрольных пробирок после двух суток культивирования при 37°C секторным методом [6] на плотную питательную среду Сабуро в чашки Петри. Чашки с посевами выдерживали при 37°C в течение суток. Контроль культуры содержал питательную среду Сабуро и соответствующее количество исследуемой культуры. Контроль эмульгатора содержал полисорбат-80 в разведениях, соответствующих его разведениям в опытных пробах.

Эксперименты выполнены в количестве 5 серий. Величины минимальной микостатической и микоцидной активности, а также количество КОЕ/мл каждый раз равнялись постоянной величине, что обусловлено, вероятно, степенью чувствительности применяемых стандартных методов исследования с одной стороны, а также точностью их воспроизведения. В связи с указанным, статистическая обработка данных по определению стандартного отклонения полученных показателей не проводилась.

Результаты и обсуждение

Результаты определения противогрибкового действия эвгенола методом серийных разведений в жидкой среде Сабуро представлены в таблице 1. Среда оставалась прозрачной (видимого роста не наблюдалось) после двух суток культивирования в концентрации эвгенола до 0,025объём.% включительно, а в контроле эмульгатора в

концентрации 0,1 объём.%. Таким образом, МИК эвгенола для культуры *Candida albicans* ATCC 885-653 составляла 0,025 объём.%, а полисорбата – 80–0,1 объём.%.

В то же время, после пересева содержимого пробирок на среду Сабуро в чашках Петри, отсутствие роста обнаружено в концентрации до 0,05 объём.% (таблица 2), что расценивалось как минимальная фунгицидная концентрация.

В контроле эмульгатора в указанных разведениях фунгицидная активность не обнаружена.

Полученные нами результаты подтверждают литературные данные относительно высокого уровня противогрибковой активности эвгенола [17]. Механизм антимикробной активности эвгенола заключается в воздействии на синтез компонентов клеточной стенки (бета-гликанов, хитина, мананнов) путем воздействия на важные мембрано-связанные ферменты [8,10]. Влияние на структуру оболочки *C. albicans* считается практически значимым, поскольку это означает возможность воздействия на такой фактор патогенности, как адгезивные свойства (уменьшение способности гриба колонизировать ткани организма-хозяина) [13,14]. Также это приводит к морфологической трансформации в гифовую форму (увеличение его инфекционности) [2,14].

Однако, в литературных источниках не освещены вопросы влияния эвгенола на грибы рода *Candida* в концентрациях меньше микостатической. Поэтому был осуществлен пересев культуры с жидкой питательной среды на плотную среду Сабуро секторным методом для оценки количественных показателей влияния эмульсии эвгенола на грибы рода *Candida* в концентрациях ниже микостатической. Результаты секторного посева представлены в таблице 3.

В контроле культуры количество КОЕ/мл равнялось 5×10^6 . Эвгенол в концентрации 0,025 объём.% уменьшал количество КОЕ/мл до $< 10^3$. В концентрациях от 0,0125 до 0,00313 объём.% количество КОЕ превышало соответствующий показатель контроля на один порядок, стабильно равняясь 5×10^7 .

Такое увеличение количества КОЕ/мл в опытных пробирках в интервале концентраций эвгенола от 0,0125 объём.% до 0,00313 объём.% по сравнению с контролем (постмикостатическое действие), по нашему мнению, заслуживает дополнительного анализа. По нашему предположению в данном диапазоне концентраций эвгенол:

- создает неблагоприятное влияние на эталонный штамм, вследствие чего культура активизирует генетически обусловленный потенциал;
- под влиянием эвгенола уменьшается прочность связи между клетками и они в большей степени были разъединены при встряхивании;
- это могут быть также определенные неучтенные воздействия.

Выяснение реальной причины указанного явления требует проведения дополнительных исследований. Однако, безусловным является факт различия данных опытных показателей от контрольной пробы, следовательно, наблюдается определенное влияние эвгенола в указанных разведениях.

Выводы. В результате проведенных исследований было установлено, что эвгенол, эмульгированный в полисорбате-80 оказывал высокое противогрибковое действие на культуру *Candida albicans* ATCC 885-653 (минимальная микоцидная концентрация составила 0,5 объём.%), минимальная микостатическая концентрация – 0,025 объём.%). Постмикостатические концентрации эвгенола приводили к увеличению количества КОЕ/мл по сравнению с контролем в 10 раз. Снижение концентрации эвгенола ниже МИК может способствовать повышению колонизационного потенциала грибов *Candida albicans* ATCC 885-653. Полисорбат-80 обеспечивал получение эмульсии эвгенола и проявлял противогрибковую активность в концентрации до 0,1 объём.% включительно.

Литература

1. [Лобань](#) ГА, [Федорченко](#) ВІ. Мікробіологія, вірусологія та імунологія порожнини рота. Полтава: Верстка; 2003.
2. Капустина ОА, Карташова ОЛ. Факторы патогенности грибов *Candida* и возможность их регуляции эфирными маслами. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2013; 1:1-10.
3. Міністерство охорони здоров'я України. Наказ № 167, 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». <http://www.mif-ua.com/archive/article/4835>
4. Мінухін ВВ, Коваленко НІ, Ткаченко ВЛ, Замазій ТМ, Гвоздецька АВА, Коваленко ЮД. Комбінована дія ефірної олії мануки з антибіотиками по відношенню до збудників інфекцій верхніх дихальних шляхів в дослідях *in vitro*. *Biomedical and biosocial anthropology* 2014; 22 : 67- 70.
5. Челпаченко ОЕ., Перунова НБ., Иванова ЕВ., Андрищенко СВ., Данилова ЕИ., Федотова ЛП. Микробиологические аспекты антимикотической фитотерапии. Проблемы мед. Микологии. 2014; Т.16, 3:13-19.
6. Шевченко БФ, Бабій ОМ, Татарчук ОМ, Макаручук ВА, Петишко ОП, Вінник НВ. Діагностичні особливості вмісту кістозних утворень підшлункової залози. Клінічна хірургія. 2016 № 6: 28-31.
7. Ananieva MM, Faustova MO, Basarab IO, Loban GA. Antimicrobial effect of proteflazid extract on microflora of peri-implant areas in infectious and inflammatory complications after

- dental implantation. Запорожский медицинский журнал. 2017 Ноябрь-декабрь 19; 6(105): 809–812.
- 8.Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchiki T., Remmal A. Lett. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Appl. Microbiology*. 2004;38:454.
- 9.Boonchird C., Flegel T.W. In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. Microbiol.* 1982; 28(11):1235-1241.
- 10.Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Alfieri M. Эвгенол и тимол по отдельности и в сочетании вызывают морфологические изменения оболочки *Candida albicans*. Репродуктивное здоровье в Беларуси. 2009; 5(05):38-44.
- 11.Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR., et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88: 170–175.
- 12.Gallucci MN, Carezzano ME, Oliva MM, Demo MS, Pizzolitto RP, Zunino MP, et al. In vitro activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol.* 2014 Apr;116(4):795-804.
- 13.Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*. 2015;6(4):338-46.
- 14.Odds F. C. Pathogenesis of fungal disease .*Oxford Textbook of Medical Mycology: A Handbook of Scientists and Clinicians: Oxford; 2017.*
- 15.Petrushanko TA, Chereda VV, Loban' GA. [Role of oral cavity colonization resistance in dental caries development]. *Stomatologia (Mosk)*. 2013;92(1):43-5.
- 16.Petrushanko TA, Tchereda VV, Loban GA. [The screening diagnostic of micro ecological disorders of oral cavity]. *Klin Lab Diagn.* 2014 Jun;(6):48-50. [Article in Russian].
- 17.Reginato CF, Bandeira LA, Zanette RA, Santurio JM, Alves SH, Danesi CC. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against *Candida dubliniensis* before and after in vitro fluconazole exposure. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Jan-Feb;50(1):75-79.
- 18.Espir CG, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Chávez-Andrade GM, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Solubility and bacterial sealing ability of MTA and root-end filling materials. *J Appl Oral Sci.* 2016 Apr;24(2):121-5.

**КОМПЛЕКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОГО ДЕЙСТВИЯ ЭМУЛЬСИИ
ЭВГЕНОЛА В ПОЛИСОРБАТЕ-80
НА ЭТАЛОННЫЙ ШТАММ *Candida albicans* ATCC 885-653**

Федорченко В. И., Полянская В. П., Зачепило С. В., Боброва Н. А., Лобань Г. А.

*Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава, Украина*

Резюме. Целью данного исследования было комплексное изучение действия эвгенола, эмульгированного в полисорбате-80 на культуру *Candida albicans* ATCC 885-653 путем определения минимальной ингибирующей, микоцидной и микостатической концентраций, а также показателей интенсивности размножения грибов в постмикостатических концентрациях эвгенола. **Материалы и методы.** Минимальную ингибирующую, микоцидную и микостатическую концентрации эмульсии эвгенола в полисорбате-80 для грибов *Candida albicans* ATCC 885-653 определяли методом последовательных макроразведений в жидкой питательной среде Сабуро с последующим пересевом содержимого пробирок на плотную среду Сабуро. Количество колониобразующих единиц в 1 мл культуры *Candida albicans* ATCC 885-653 определялась секторным методом. **Выводы:** Доказана высокая противогрибковая активность эмульсии эвгенола в полисорбате-80 для культуры *Candida albicans* ATCC 885-653. В то же время постмикостатические концентрации эвгенола приводили к увеличению количества колониобразующих единиц в 1мл в 10 раз по сравнению с контролем, что может способствовать повышению колонизационного потенциала грибов в данном диапазоне концентраций.

Ключевые слова: Эвгенол, полисорбат-80, *Candida albicans*, противогрибковое действие.

***Candida albicans* ATCC 885-653 ეტალონურ შტამზე
პოლისორბატ-80-ში ევგენოლის ემულსიის
სოკოს სანინააღმდეგო მოქმედების კომპლექსური შესწავლა
ფედორჩენკო ვ. ი., პოლიანსკაია ვ. პ., ზაჩეპილო ს. ვ.პ., ბობროვა ნ. ა., ლობან
გ. ა.**

უკრაინის უმაღლესი სახელმწიფო სასწავლო დაწესებულება "უკრაინის სამედიცინო სტომატოლოგიური აკადემია", ქ. პოლტავა, უკრაინა.

რეზიუმე. მოცემული კვლევის მიზანი იყო *Candida albicans* ATCC 885-653 კულტურაზე პოლისორბატ-80-ში ემულგირებული ევგენოლის მოქმედების კომპლექსური შესწავლა მინიმალური ინჰიბიტორული, მიკოციდური და მიკოსტატიკური კონცენტრაციების განსაზღვრის გზით, და აგრეთვე, სოკოს გამრავლების ინტენსივობის მაჩვენებლებს განსზღვრა ევგენოლის პოსტმიკოსტატიკურ კონცენტრაციებში. **მასალები და მეთოდები.** *Candida albicans* ATCC 885-653 სოკოებისთვის პოლისორბატ-80-ში ევგენოლის ემულსიის მინიმალური ინჰიბიტორული, მიკოციდური და მიკოსტატიკური კონცენტრაციები განისაზღვრებოდა საბუროს თხევად საკვებ გარემოში თანმიმდევრული მაკროგაზავების მეთოდით, სინჯარის შიგთავსის მომდევნო გადათესვით საბუროს მკვრივ გარემოში. *Candida albicans* ATCC 885-653 კულტურის 1 მლ კოლონიების ფორმირების ერთეულთა რაოდენობა განისაზღვრებოდა სექტორული მეთოდით. **დასკვნები:** *Candida albicans* ATCC 885-653 კულტურისთვის დადასტურებულია პოლისორბატ-80-ში ევგენოლის ემულსიის მაღალი სოკოს სანინააღმდეგო აქტივობა. ამავედროულად, ევგენოლის პოსტმიკოსტატიკურმა კონცენტრაციებმა გამოიწვია 1 მლ კოლონიების ფორმირების ერთეულების რიცხვის 10-ჯერადი ზრდა კონტროლთან შედარებით, რაც შეიძლება ხელი შეუწყოს ამ კონცენტრაციის დიაპაზონში სოკოების კოლონიზაციური პოტენციალის მომატებას.

საკვანძო სიტყვები: ევგენოლი, პოლისორბატ-80, *Candida albicans*, სოკოს სანინააღმდეგო მოქმედება.

COMPREHENSIVE STUDY OF ANTI-FUNGAL EFFECT OF EVGENOL EMULSION IN POLYSORBAT-80 ON REFERENCE STRAIN OF

***Candida albicans* ATCC 885-653**

Fedorchenko V.I., Polyanskaya V.P., Zachepilo S.V., Bobrova N.A., Loban G.A.

*Higher State Educational Institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy",
Poltava*

Summary

*The aim of this research was a comprehensive study of the polysorbate - 80 emulsified eugenol effect on the culture of *Candida albicans* ATCC 885-653 by determining of minimal mycostatic, mycocidal concentrations and indexes of fungi reproduction intensity in postmycostatic eugenol concentrations. **Materials and methods.** Minimal mycostatic and mycocidal concentrations was determined by sequential makrodilution of eugenol emulsion in Sabouraud liquid medium with next transferring the tubes' contents on the solid Sabouraud*

medium. The amount of colony forming units /ml of *Candida albicans* ATCC 885-653 was determined by the sector method. **Conclusions.** The high antifungal activity of the eugenol emulsion in polysorbate-80 for the *Candida albicans* ATCC 885-653 culture has been proven. However, postmicostatic concentrations of eugenol led to increasing the number of colony-forming units per 1ml 10 times compared with control, it can promote increasing the colonization potential of fungi in this range of concentrations.

Key words: eugenol, polysorbate-80, Candida albicans, antifungal action.

Таблица 1. Определение минимальной ингибирующей концентрации эмульсии эвгенола в полисорбате-80 для эталонного штамма *Candida albicans* ATCC 885-653 в жидкой среде Сабуро

объем.%. Серии эксперимента	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль культуры
Опыт	-	-	-	+	+	+	+
Контроль эмульгатора	-	+	+	+	+	+	+

Примечания: «+» - видимый рост культуры; «-» - отсутствие видимого роста.

Таблица 2

Определение минимальной микоцидной и микостатической концентраций эмульсии эвгенола в полисорбате-80 для эталонного штамма *Candida albicans* ATCC 885-653

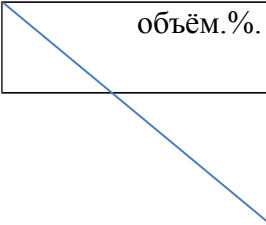
объем.%. Серии эксперимента	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль культуры
Опыт	-	-	-	+	+	+	+
Контроль эмульгатора	-	+	+	+	+	+	+

Серии эксперимента							культуры
Опыт	-	-	+	+	+	+	+
Контроль эмульгатора	+	+	+	+	+	+	+

Примечания: «+» - видимый рост культуры; «-» - отсутствие видимого роста.

Таблица 3

Количество КОЕ/мл эталонного штамма *Candida albicans* ATCC 885-653 в среде Сабуро в условиях культивирования с различными концентрациями эмульсии эвгенола в полисорбате-80.

объем.%. 	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль
---	-----	------	-------	--------	---------	---------	----------

Серии эксперимента							культуры
Опыт	-	-	$<10^3$	5×10^7	5×10^7	5×10^7	5×10^6
Контроль эмульгатора	$<10^3$	5×10^6	5×10^6	5×10^6	5×10^6	5×10^6	5×10^6

Авторы:

Фамилия, имя, отчество	Рабочий телефон	Домашний телефон	Домашний адрес	Подпись
Федорченко Вера Ивановна	+38(053)252774 5	+38(066)507075 9	Полтавская обл., Полтавский р-н, С Супруновка,	

			Ул. Дружбы, 12	
Полянская Валентина Павловна	+38(053)252774 5	+38(095)690849 0	г. Полтава, ул. Железная, 42, кв. 85	
Зачепило Светлана Викторовна	+38(053)252774 5	+38(099)718215 5	г. Полтава, пер. Латышева, 8, кв. 48	
Боброва Нелля Александровна	+38(053)252774 5	+38(066)740956 2	г. Полтава, ул. Сенная, 26, кв. 6	
Лобань Галина Андреевна	+38(053)252774 5	+38(055)504393 7	г. Полтава, ул. Черновола, 26, кв. 92	