

**НЕКОТОРЫЕ КРИСТАЛЛОСКОПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕЗИНФЕКТАНТОВ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ КРИСТАЛЛОСКОПИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ В ДЕЗИНФЕКЦИИ И ДЕЗИНВАЗИИ**

**С.П. АШИХМИН**

кандидат медицинских наук

**О.Б. ЖДАНОВА**

доктор биологических наук

*Кировская государственная медицинская академия,*

*Киров, К. Маркса, 112, e-mail: oliabio@yandex.ru*

**А.К. МАРТУСЕВИЧ**

кандидат медицинских наук

*Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,*

*Н.Новгород*

**Л.А. НАПИСАНОВА**

кандидат биологических наук

**Е.С. КЛЮКИНА**

аспирант

*Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии*

*им. К.И. Скрябина, 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28,*

*e-mail: [vigis@ncport.ru](mailto:vigis@ncport.ru)*

**Одновременное применение микробиологических, экологических и кристаллоскопических методов можно использовать для оценки токсичности и антибактериальной активности дезинфектантов. Дезинфицирующее действие растворов азиды натрия изучено на модели патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus anthracis*) и аборигенной микрофлоры. Токсичность азиды натрия оценивали на основании анализа мочи мышей после его дачи.**

Ключевые слова: кристаллографические методы, тизиграфия, токсичность, золотистый стафилококк, аборигенная микрофлора.

Исследование свойств различных препаратов для дезинфекции и дезинвазии представляет значительный интерес для здравоохранения и сельского хозяйства. Однако большинство работ в этой области включают только микробиологические методы, а другие, не менее информативные подходы к их оценке подчас игнорируются. К таковым, в частности, могут быть причислены кристаллоскопические методы [1–7]. Попытки использования метода кристаллизации в отношении различных веществ в фармакологии и фармации отмечают уже с начала тридцатых годов XX в. [2, 3], но основной задачей в этих работах была идентификация состава препаратов [3].

Предложен ряд теорий, позволяющих трактовать результаты кристаллообразования, в том числе теория «функциональной морфологии биологических жидкостей» В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной [14], теория кристаллизации белка «Протос» Е.Г. Рапис [11] и некоторые другие, но каждая из них охватывает лишь отдельный аспект проблемы, тогда как интегративный подход в понимании природы, сущности и информационной емкости кристаллизации соединений органического и минерального происхождения до сих пор остаются нераскрытыми [2, 4, 5, 15]. В тоже время важным становится уточ-

нение роли кристаллоскопических подходов в оценке свойств различных объектов, таких как неорганические (соли, кислоты, щелочи) и биогенные субстанции (белки, жиры, моно- и полисахариды, вещества с более сложной органической структурой) [4, 6, 9, 15, 18].

Нужно учитывать, что важность использования дезинфектантов сочетается с вероятностью нанесения ущерба здоровью людей и объектам биосферы. При обработке сельскохозяйственных угодий и урбаноземов химические вещества поступают в окружающую среду (почву, воду, воздух), далее в продукты питания, а последние попадают в организм человека и животных. Образуются так называемые пищевые или трофические цепи. Находясь в окружающей среде даже на уровнях, не вызывающих выраженных токсических эффектов, химические вещества оказывают хроническое действие, которое приводит к дезадаптации организма, напряжению иммунорегуляторных механизмов, развитию вторичного иммунодефицита, снижению иммунитета. Неблагоприятные последствия применения пестицидов могут проявляться острыми и хроническими отравлениями, а также отдаленными (через 1–25 лет) эффектами от без- и донозологических нарушений в организме человека до повышения общей и специфической заболеваемости.

Поднимается вопрос об экологической оценке эффекта противомикробных и противогельминтных средств. Данная оценка включает в себя, с одной стороны, экологию человека и диагностику его состояния с учетом действия экзогенных факторов, и, с другой стороны, экологический мониторинг окружающей среды и его объектов как непосредственно, так и во взаимосвязи живой и неживой природы, а также внутри биогеоценозов [15, 20]. Это подчеркивает значимость исследования взаимоотношений микро- и макромира, в том числе и в аспекте патогенности. Данный тезис выдвигает на первый план изучение средств и подходов, позволяющих сохранить баланс между аутохтонной, условно-патогенной и патогенной микрофлорой, что обеспечит исключительно симбиотический характер взаимодействия микро- и макроорганизмов в рассматриваемом биоценозе.

К наиболее значимым тенденциям развития дезинфектологии в настоящее время могут быть причислены нарастание ассортимента и эффективности современных дезинфицирующих средств. Однако повышение химической и/или биологической активности дезинфектантов, как правило, сопровождается параллельным ростом их токсичности. Данный факт требует проведения тщательных испытаний предлагаемого препарата, с целью чего наиболее часто применяют различные биологические модели [10, 20].

Значительный интерес представляет рассмотрение данной проблемы в ракурсе токсичности как механизма нарушения гомеостаза целостного организма, а, следовательно, и физико-химических свойств его биосубстратов. Принятие в расчет этого аспекта вопроса позволяет оценивать патогенное воздействие дезинфектанта косвенным путем – с помощью анализа кристаллообразующих и иницирующих свойств одной или нескольких биологических сред по значимому отклонению тизиокристаллоскопической картины от «паттерна», характерного для здорового организма [6, 7]. Это позволяет рассматривать наблюдаемые сдвиги в позиции теории адаптации к агенту или фактору.

Картина дегидратации раствора любого компонентного состава есть результирующая многочисленных параметров, наиболее значимыми из которых являются [1, 2, 12, 16, 18]:

- непосредственно химическая структура основного вещества (или каждого из нескольких);
- особенности подложки, на которой осуществляется высушивание образца (стекло, пластик и т. д.);
- воздействующие факторы окружающей среды – элементы макроокружения (температура, влажность воздуха, скорость и направление его потоков и др.);

- информационная емкость растворителя (например, наличие и особенности водных кластеров) и характер его взаимодействия с растворенным в нем веществом.

С учетом многообразия приведенных выше факторов одним из наиболее важных является концентрация исходного раствора [1, 2]. Данный параметр может не только способствовать изменению размеров частиц кристаллического и/или аморфного строения, но и играть роль в конфигурационных преобразованиях элементов и трансформации характера взаимодействий с микроокружением. Большинство исследователей уделяют преимущественное внимание химическим свойствам препарата, тогда как его концентрация, имеющая, как показано выше, не меньшее значение, практически не учитывается [2, 9].

В связи с этим, целью исследования является изучение кристаллообразующих и иницирующих свойств, дезинфицирующей и дезинвазирующей активности и токсичности азиды натрия.

### **Материал и методы**

В качестве анализируемого дезинфицирующего вещества были взяты образцы растворов азиды натрия в концентрации 0,1 %, 0,3 и 0,5 %.

Изучение дезинфицирующей активности азиды натрия проведено путем оценки количества колоний тестовых патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus anthracis*) до и после воздействия дезинфектанта (время экспозиции со смесью микроорганизмов 10 мин), причем исходный уровень в дальнейших расчетах принимали за 100 %. Токсичность оценивали с использованием аутохтонной микрофлоры (*Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) и воздействия на яйца нематод, трематод и цестод. Чашки с посевами для выделения аэробных бактерий помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение двух суток, для выделения анаэробных микроорганизмов использовали микроанаэроостат с последующей инкубацией в аналогичных условиях в течение трех суток. После инкубации посевов все типы выросших колоний подсчитывали и микроскопировали. Идентификацию выделенных бактерий осуществляли общепринятыми методами. Яйца гельминтов вносили в 0,1%-ный раствор азиды натрия.

Оценку токсичности препарата *in vivo* проводили на 12 здоровых белых мышах. Методика эксперимента предусматривала нахождение животных в атмосфере паров раствора азиды натрия, находящегося в той же камере и самостоятельно испаряющегося внутрь нее.

Длительность пребывания мышей в камере была постоянной и составляла 1 ч в течение 30 сут подряд. В качестве основного материала для кристаллоскопического анализа использовали мочу мышей до начала эксперимента, а также сразу по окончании токсического воздействия на 3, 7, 14 и 30-е сутки.

В комплекс кристаллоскопических методов исследования вошли классическая кристаллоскопия, позволяющая установить особенности собственного кристаллообразования биосреды, а также дифференциальная тезиграфия, визуализирующая инициаторный потенциал биожидкости [2, 8]. Учет результатов собственного кристаллогенеза осуществляли путем использования идентификационной таблицы кристаллических и аморфных образований, а также системы количественных и полуколичественных критериев [8].

Тезиграфический компонент оценивали путем нахождения значений системы основных и дополнительных показателей, характеризующих физико-химические свойства исследуемой биологической среды, а также осуществляли подсчет производных коэффициентов тезиокристаллоскопии [8, 9]. Микробиологические исследования проводили по общепринятым методикам.

Статистическую обработку данных выполняли в среде электронных таблиц Microsoft Excel 2007, а также программных пакетах SPSS 11.0 и Primer of biostatistics 4.03.

### Результаты и обсуждение

При воздействии 0,1%-ного раствора азид натрия на яйца нематод (токсокар, аскарид и токсокарид) отмечали гибель в течение суток; яйца цестод и трематод погибали в течение часа. При изучении овоцидных свойств в микроделянчном опыте также учитывали анализы микрофлоры почвы до и после внесения азид натрия. С этой целью применили 0,05%-ный раствор азид натрия для изучения овоцидной активности в отношении яиц токсокар. Была отмечена гибель 30 % яиц в первые сутки и 63 % во вторые сутки инкубирования в растворе азид натрия. Таким образом, азид натрия можно рекомендовать для дегельминтизации почвы в местах скопления фекалий собак и кошек. Однако возникает необходимость проверки безопасности препарата для газонных растений и полезной почвенной микрофлоры.

С этой целью были проведены опыты на микроделянках площадью 1 м<sup>2</sup>, выделенных на типичном уличном газоне в центре г. Кирова. На подготовленные обычным способом участки высевали смесь газонных трав «SPORT», состоящую из овсяницы красной (40 %), мятлика лугового (30 %), райграса пастбищного (25 %) и овсяницы овечьей (5 %) и изучили действие препарата на аборигенную микрофлору (табл.).

Изменение видового состава фототрофов почвы под воздействием азид натрия

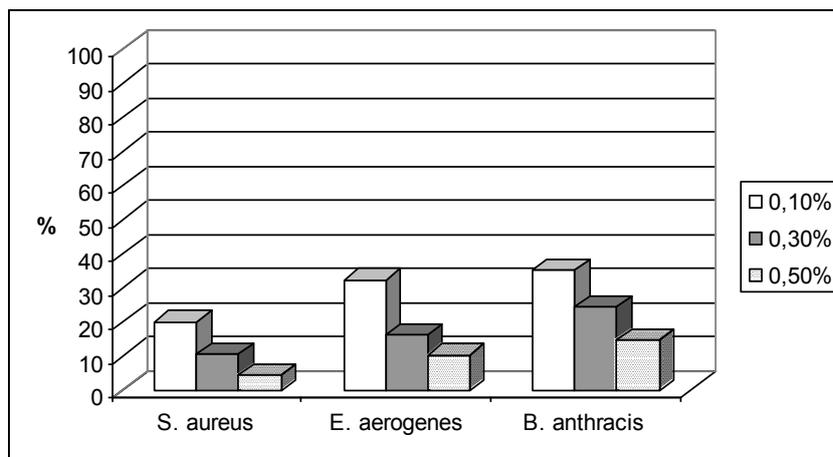
№ п/п	Название вида	Время отбора проб			
		24.09.07		10.03.08	
		кон-троль	азид	кон-троль	азид
<b>Цианопхита</b>					
1	<i>Cylindrospermum licheniforme</i> (Bory) Kütz.		+		
2	<i>Leptolyngbya foveolarum</i> Anagn. et Kom.		+	+	+
3	<i>L. frigida</i> Anagn. et Kom.		+	+	+
4	<i>L. henningsii</i> Anagn. et Kom.				+
5	<i>Microcoleus vaginatus</i> Gom. f. <i>vaginatus</i>	+	+	+	+
6	<i>Phormidium aerugineo-coeruleum</i> (Gom.) Anagn. et Kom.			+	+
7	<i>Ph. autumnale</i> (Ag.) Gom.	+	+		+
8	<i>Ph. formosum</i> (Bory ex Gom.) Anagn. et Kom.	+	+	+	+
9	<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterb.			+	
<b>Еугленопхита</b>					
10	<i>Euglena mitabilis</i> Schmitz		+		
<b>Бацилариопхита</b>					
11	<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grun.	+	+	+	+
12	<i>Luticola mutica</i> v. <i>mutica</i> (Kütz.) Mann in Roundetal.		+		+
13	<i>Navicula mutica</i> var. <i>binodis</i> Hust.		+	+	+
14	<i>Navicula pelliculosa</i> (Breb) Hisle		+	+	+
15	<i>Nitzschia palea</i> (Kütz.) W.Sm. var. <i>palea</i>		+	+	+
16	<i>Pinnularia borealis</i> Her.				+
<b>Криптофита</b>					
17	<i>Cryptomonas tenuis</i> Pasch.			+	+
<b>Хлорофита</b>					
18	<i>Chlamydomonas gloeogama</i> Korsch.		+		
19	<i>Ch. minutissima</i> Korsch.		+		
20	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer.		+	+	
21	<i>Chlorella minutissima</i> Fott et Novakova		+	+	
22	<i>Chlorococcum</i> sp.		+		
23	<i>Follicularia starrii</i> Luke'ova			+	
Всего видов		4	17	14	14

Установлено, что азид натрия действует на высшие растения (смесь газонных трав, 3-хнедельные всходы) как гербицид. Под влиянием азид натрия происходило снижение видового обилия почвенных водорослей и цианобактерий, а также резко возрастало в структуре популяций микромицетов доля грибов с окрашенным мицелием, что указывает на повышение уровня загрязнения почвы.

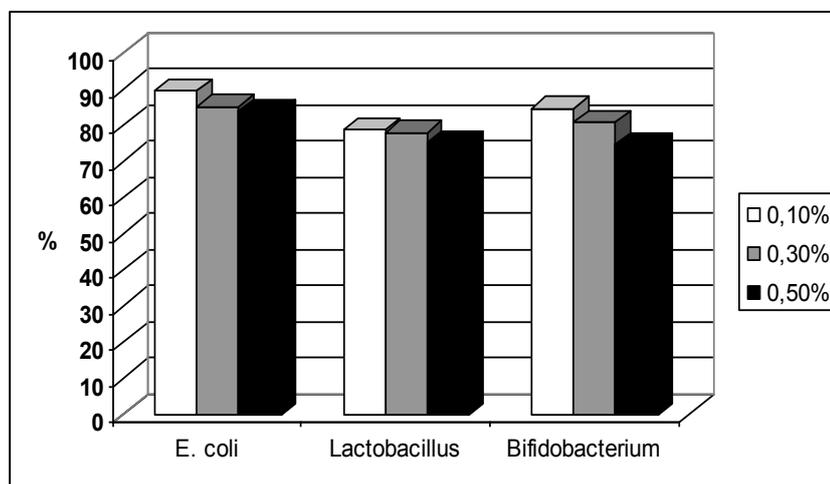
Также на основании микробиологических исследований показано, что препарат обладает антибактериальной активностью в отношении изученной патогенной микрофлоры, причем дезинфекционный потенциал нарастает с увеличением концентрации агента (рис. 1).

Дезинфицирующая активность азид натрия и его влияние на аборигенную микрофлору сравнили с его токсичностью для аутохтонной микрофлоры (оценка *in vitro*) (рис. 2). Это позволило выделить оптимальную концентрацию дезинфектанта. 0,3%-ный раствор азид натрия обладал достаточной дезинфицирующей активностью при допустимой токсичности.

В связи с этим исследования токсичности *in vivo* (на лабораторных мышах) продолжены только с данной концентрацией.

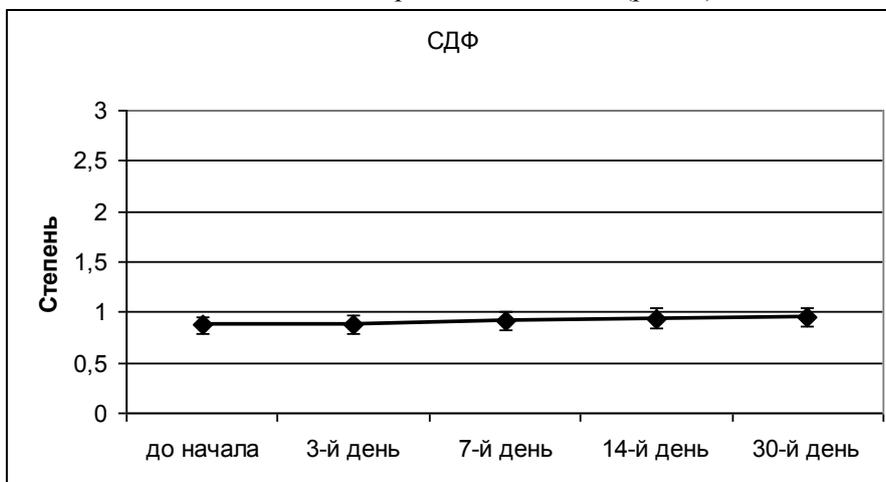


**Рис. 1.** Дезинфицирующая активность азид натрия в отношении различных патогенов (в % к количеству колоний интактного биоматериала)



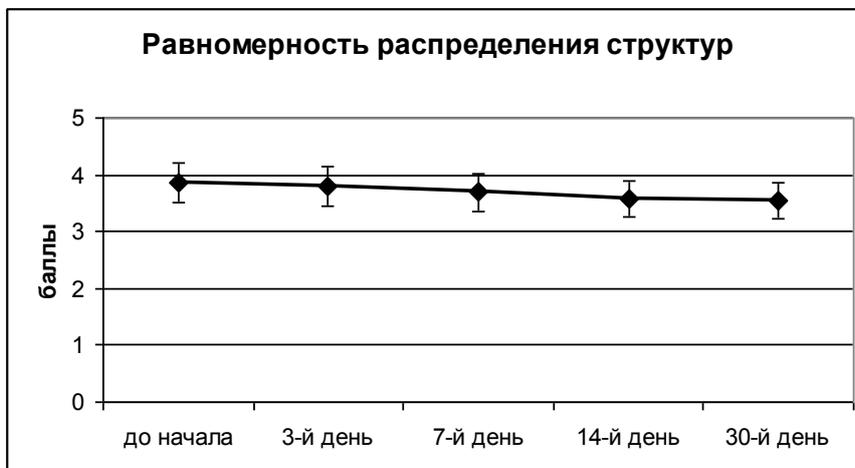
**Рис. 2.** Токсичность в отношении аутогенной флоры (в % к количеству колоний интактного биоматериала)

Результаты изучения собственного кристаллогенеза мочи мышей в хроническом эксперименте с воздействием азиды натрия подтвердили низкую токсичность средства. Это продемонстрировано на примере степени деструкции фации – одного из наиболее показательных критериев нарушения гомеостаза биологической жидкости и организма в целом (рис. 3).



**Рис. 3.** Динамика степени деструкции кристаллоскопической фации мочи мышей в процессе хронического эксперимента

Данные тенденции нашли полное подтверждение при анализе равномерности распределения элементов кристаллоскопической фации (рис. 4). По этому показателю, как и по степени деструкции, не наблюдали достоверных различий даже между исходным состоянием и конечной точкой исследования ( $P > 0,05$ ).



**Рис. 4.** Динамика равномерности распределения элементов по кристаллоскопической фации мочи мышей в процессе хронического эксперимента

В отношении сравнительной тезиграфии было обнаружено достоверное повышение основного тезиграфического коэффициента  $Q$  на 7-е сутки эксперимента, что трактуется как адаптивная перестройка компонентного состава биожидкости, которая полностью нейтрализуется к 30-м суткам (рис. 5). К

этому сроку уровень данного критерия практически сравнивается с первоначальным ( $P > 0,05$ ).

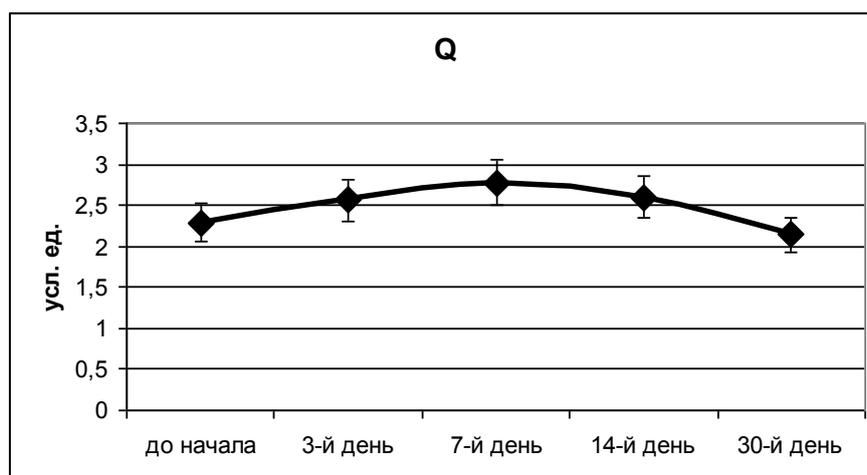


Рис. 5. Основной тезиграфический коэффициент Q мочи мышей в хроническом эксперименте

В целом установлена четкая зависимость между испытываемыми концентрациями водного раствора азид натрия и образуемой ими кристаллоскопической картиной. Выявлено, что наиболее характерной кристаллической формой (морфотипом) для данного соединения является одиночно-кристаллическая структура типа «пирамида». В то же время размеры данного элемента существенно варьируют. Кроме того, в микропрепарате обнаружили структуры с широко варьирующими габаритами.

Так, при нарастании концентрации дезинфицирующего средства от 0,1 % к 0,5 % наблюдали значительные сдвиги по параметрам: доля крупных (агрегатных) структур; перераспределение кристаллических элементов картины в сторону краевой зоны («латерализация фации»).

Сведения о фации, образуемой собственно самим дезинфектантом, могут быть использованы для идентификации средства с учетом его концентрации в растворе [7, 9].

Таким образом, предложенный комплексный алгоритм с одновременным применением микробиологических и кристаллоскопических методов можно использовать для изучения свойств различных дезинфектантов.

Азид натрия обладает выраженной дезинфицирующей активностью в отношении рассмотренных патогенных микроорганизмов, но малотоксичен относительно аутохтонной микрофлоры, а также в эксперименте *in vivo*.

Азид натрия при дегидратации способен образовывать фацию с постоянным компонентным составом, представленным одиночными кристаллами типа «пирамида», а также имеет четкий инициаторный потенциал в отношении различных базисных веществ, которые зависят от его исходной концентрации.

Определение кристаллоскопических особенностей дезинфицирующего средства можно использовать при определении степени чистоты и соответствия его концентрации требуемым величинам.

#### Литература

1. Барер Г.М., Денисов А.Б., Михалева И.Н. и др. Кристаллизация ротовой жидкости. Состав и чистота поверхности подложки // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1998. – Т. 126, № 12. – С. 693–696.

2. Воробьев А.В., Мартусевич А.К., Перетягин С.П. Кристаллогенез биологических жидкостей и субстратов в оценке состояния организма. – Нижний Новгород: «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. – 384 с.
3. Лобанов В.И. Микрорентгенографические реакции обнаружения некоторых производных барбитуровой кислоты // Журнал аналит. химии. – 1966. – № 1. – С. 110.
4. Локтюшин А.А., Манаков А.В. Минералы и жизнь в голографической модели вещества // Тез. 2-го Междунар. сем. «Минералогия и жизнь: биоминеральные взаимодействия». – Сыктывкар, 1996. – С. 10–11.
5. Мартусевич А.К. Информационная физико-биохимическая теория кристаллизации как отражение морфологии биологических жидкостей // Бюл. сиб. мед. – 2005. – Т. 4. – С. 185.
6. Мартусевич А.К. К методике изучения физиологической активности лекарственных средств кристаллографическими методами // Тез. докл. V науч. конф. «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». – Сыктывкар, 2006. – С. 79–81.
7. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Метод тезиокристаллографии в идентификации качества лекарственного препарата // Фармация. – 2006. – № 6. – С. 15–17.
8. Мартусевич А.К. Количественная оценка результата свободного и инициированного кристаллогенеза биологических субстратов. – Нижний Новгород: «ННИИТО Росмедтехнологий», 2008. – 28 с.
9. Мартусевич А.К., Гришина А.А., Камакин Н.Ф. Фармакобиокристаллология: современное состояние и перспективы // Мол. мед. – 2010. – № 4. – С. 22–25.
10. Перетягин С.П. и др. Лабораторные животные в экспериментальной медицине. – Нижний Новгород: «ННИИТО Росмедтехнологий», 2011. – 300 с.
11. Рапис Е.Г. Белок и жизнь. Самоорганизация, самосборка и симметрия наноструктурных супрамолекулярных пленок белка. – М.: «МИЛТА – ПКП ГИТ», 2003. – 368 с.
12. Тарасевич Ю.Ю., Константинов В.О., Аюпова А.К. Моделирование дендритного роста кристаллов соли в биологических жидкостях // Изв. вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки, 2001. – Спецвыпуск. Математическое моделирование. – С. 147–149.
13. Тахер М.А. Ассад Судебно-медицинская диагностика прижизненного повешения по кристаллографической структуре биологических жидкостей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Киев, 1995. – 16 с.
14. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. – М.: Хризопраз, 2001. – 304 с.
15. Юшкин Н.П., Гаврилюк М.В., Голубев Е.А. Сингенез, взаимодействие и коэволюция живого и минерального миров: абиогенные и углеводородные кристаллы как модели протобиологических систем. Концепция кристаллизации жизни // Информ. бюл. РФФИ. – 1996. – Т. 4. – С. 393.
16. Azoury R., Garside J., Robertson W. G. Calcium oxalate precipitation in a flow system: An attempt to stimulate in the early stages of stone formation in the renal tubules // J. Urol. – 1986. – V. 136, № 1. – P. 150–153.
17. Chernov A.A. Crystall growth and crystallography // Acta Crystallography. – 1998. – V. 54, № 1. – P. 859–872.
18. Jones W.T., Resnick M. The characterization of soluble matrix proteins in selected human renal calculi using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // J. Urology. – 1990. – V. 144, № 4. – P. 1010–1014.
19. Lanzalaco A.C., Singh R.P., Senesco S.A. The influence of urinary macromolecules on calcium oxalate monohydrated crystal growth // J. Urol. – 1988. – V. 139, № 1. – P. 190–195.
20. Martusevich A.K., Zhdanova O.B., Rasputin P.G., Koshkin A.N. Disinfectant activity and crystallogenesis features of the new agent taking in consideration

its concentration // In.: Advanced disinfectants and safety techniques applied in pathogen treatment. – Kirov: RPEM RACEM Ltd, 2006. – P. 204–214.

**Some crystalloscopical properties of desinfectations  
and its potential role crystalloscopical criteries in disinfection**

**S.P. Ashihmin, O.B. Zhdanova, A.K. Martusevich, L.A. Napisanova, E.S.  
Klukina**

Simultaneous usage of microbiological, ecological and crystalloscopic methods can be used for estimation of disinfectants antibacterial and toxic activity. Disinfection action of the substance was made on the model of helminths eggs and pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus anthracis*). Toxicity in vivo was estimated on mice urine.

Keywords: crystallographic methods, tezigraphy, toxicity, *Staphylococcus aureus*, autochthonic microorganisms.