

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92>

## ОЦЕНКА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ И ЛИЗОЦИМА

Научная статья

Ракипова И.Р.<sup>1</sup>, Жеребятёва О.О.<sup>2</sup>, Азнабаева Л.М.<sup>3\*</sup>, Фомина М.В.<sup>4</sup>, Михайлова Е.А.<sup>5</sup><sup>1</sup> ORCID : 0000-0001-7637-5253;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-6751-3519;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-4028-5920;<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-7193-0243;<sup>5</sup> ORCID : 0000-0003-1074-8963;<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (lkhus[at]yandex.ru)

**Аннотация**

В статье представлены результаты оценки сочетанного действия различных концентраций водорастворимых витаминов В<sub>1</sub> (тиамина) и С (аскорбиновой кислоты) с лизоцимом в отношении *Micrococcus luteus*. В работе использован диффузионный метод оценки действия соединений. Показано, что некоторые концентрации тиамин и аскорбиновой кислоты наряду с собственной антимикробной активностью могут усиливать эффект литического действия лизоцима. Обнаруженная синергидная с лизоцимом активность водорастворимых витаминов-антиоксидантов может послужить предметом дальнейшего изучения их применения для борьбы с инфекционными заболеваниями в качестве вспомогательного антибактериального компонента с препаратами, содержащими лизоцим.

**Ключевые слова:** резистентность микроорганизмов, водорастворимые витамины, антимикробные препараты, лизоцим.

## AN EVALUATION OF THE COMBINED ACTION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS AND LYSOZYME

Research article

Rakipova I.R.<sup>1</sup>, Zherebyateva O.O.<sup>2</sup>, Aznabaeva L.M.<sup>3\*</sup>, Fomina M.V.<sup>4</sup>, Mikhailova Y.A.<sup>5</sup><sup>1</sup> ORCID : 0000-0001-7637-5253;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-6751-3519;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-4028-5920;<sup>4</sup> ORCID : 0000-0002-7193-0243;<sup>5</sup> ORCID : 0000-0003-1074-8963;<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup> Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

\* Corresponding author (lkhus[at]yandex.ru)

**Abstract**

The article presents the results of an evaluation of the combined action of different concentrations of water-soluble vitamins B<sub>1</sub> (thiamine) and C (ascorbic acid) with lysozyme against *Micrococcus luteus*. The diffusion method was used in the work to estimate the action of the compounds. It is shown that some concentrations of thiamine and ascorbic acid along with their own antimicrobial activity can enhance the lytic effect of lysozyme. The detected synergistic activity of water-soluble antioxidant vitamins with lysozyme may serve as a subject for further study of their use to combat infectious diseases as an auxiliary antibacterial component with preparations containing lysozyme.

**Keywords:** microbial resistance, water-soluble vitamins, antimicrobials, lysozyme.

**Введение**

Проблема формирования устойчивости микроорганизмов к антибиотикам приобретает все большие масштабы. В связи с этим ведётся разработка новых подходов к лечению и профилактике инфекционных заболеваний. В настоящее время поиск антибактериальных препаратов является актуальной задачей современной медицины во всем мире. Это, безусловно, необходимое, перспективное и, вместе с тем, трудоёмкое и долгосрочное направление. Синтез новых или модифицированных молекул сопровождается существенными финансовыми затратами и не всегда решает проблему. В литературе последних лет все чаще появляются публикации о возможном применении уже известных препаратов для изменения патогенного потенциала или полного подавления микрофлоры при заболеваниях микробного генеза [14]. С этих позиций представляют интерес витамины, в частности витамины С и В<sub>1</sub> – сложные химические соединения, значимость которых для организма не вызывает сомнения. Известно, что витамин С (аскорбиновая кислота) способствует повышению устойчивости организма при инфекционных заболеваниях. При С-авитаминозе наблюдается особое предрасположение к любым инфекциям, в частности, к пневмониям, вследствие снижения резистентности организма [9]. Биологическая роль витамина С в основном связана с его участием в реакциях гидроксирования, где он является донором водорода. Аскорбиновая кислота, или аскорбат, обладает антиоксидантным действием, участвует в биосинтезе специфических соединительнотканых белков: коллагена и эластина, входящих в состав хрящей, костей и стенок сосудов. Сходным действием обладает и тиамин, выступая как антиоксидант, защищая организм от разрушительных воздействий. Известно, что В<sub>1</sub>-витаминная недостаточность снижает сопротивляемость организма к некоторым хроническим инфекциям. Вместе с тем есть сведения о непосредственном влиянии водорастворимых

витаминов на отдельные патогенные, условно-патогенные и пробиотические микроорганизмы [5]. Установлено, что витамины в определенных концентрациях могут стимулировать рост одних и – ингибировать рост других бактерий. Растворы витаминов способны оказывать влияние на резистентность микроорганизмов к антибиотикам [10]. При этом, в литературе недостаточно освещен эффект применения водорастворимых витаминов в сочетании с антимикробными агентами. В частности, известно, что в комплексе с лизоцимом аскорбиновая кислота создает оптимальную кислотность среды, способную разрушить бактериальные клетки [11], [13]. В клинической практике хорошо зарекомендовали себя в лечении гнойно-воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей комбинированные препараты естественного лизоцима с пиридоксином (витамином В<sub>6</sub>), и с аскорбиновой кислотой [8], [12]. В стоматологической практике все чаще внедряют соли аскорбиновой кислоты в различных концентрациях [4]. Успешная практика сочетания различных терапевтических препаратов с витаминами послужила основанием для нашего исследования.

**Цель исследования** – оценка сочетанного действия лизоцима и различных концентраций водорастворимых витаминов В<sub>1</sub> и С на тест-культуру *M. luteus*.

#### Методы и принципы исследования

Объектом исследования была тест-культура *Micrococcus luteus (lysodeikticus) ATCC 4698*. Данный микроорганизм был выбран в качестве мишени, учитывая его известную чувствительность к лизоциму. Культивирование микроорганизма проводили на ГРМ-агаре (Оболенск, Россия). В работе использованы витамин В<sub>1</sub> (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь), витамин С (Армавирская биологическая фабрика, Россия), яичный лизоцим (Fluka BioChemika, Бельгия). Изучено действие следующих концентраций витамина В<sub>1</sub> и витамина С 50 мг/мл, 5 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,005 мг/мл, 0,005 мг/мл. Оценивалась литическая активность лизоцима в концентрациях 175 мг/мл, 87,5 мг/мл, 17,5 мг/мл, 1,75 мг/мл, 0,175 мг/мл. Разведения изучаемых соединений готовили на стерильном растворе 0,9 % NaCl.

Исследование выполнено по методикам [2], [10]. Лунки в агаре вырезали специальным пробойником диаметром 3 мм. В лунки с помощью дозатора вносили по 50 мкл растворов, используемых в эксперименте (контроль – физиологический раствор, опыт – изучаемые концентрации лизоцима, витамина В<sub>1</sub> (тиамина), витамина С (аскорбиновой кислоты), раствор лизоцима с добавлением разных концентраций витамина В<sub>1</sub>, раствор лизоцима с добавлением разных концентраций витамина С). Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 часов. При измерении зон задержки роста ориентировались на зону полного подавления видимого роста. Результаты учитывали в мм, по величине диаметра зоны подавления роста микроорганизмов вокруг лунок.

Все эксперименты были выполнены в трех повторах. Статистический анализ проводили с использованием программ Past, Microsoft Excel, Statistica. Данные представлены как среднее ± SD (стандартное отклонение). Значимость различий между контролем и вариантами эксперимента определяли с использованием метода множественных сравнений Даннета. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Основные результаты

В первой серии опытов было изучено влияние литической активности лизоцима разных концентраций на *Micrococcus luteus ATCC 4698*. В результате проведения эксперимента показано, что лизоцим в чистом виде и разведенный в 2 раза, а также в 10, 100 и 1000 раз оказывал значительное литическое действие на тест-культуру, степень которого уменьшалась при разведении (рисунок 1).

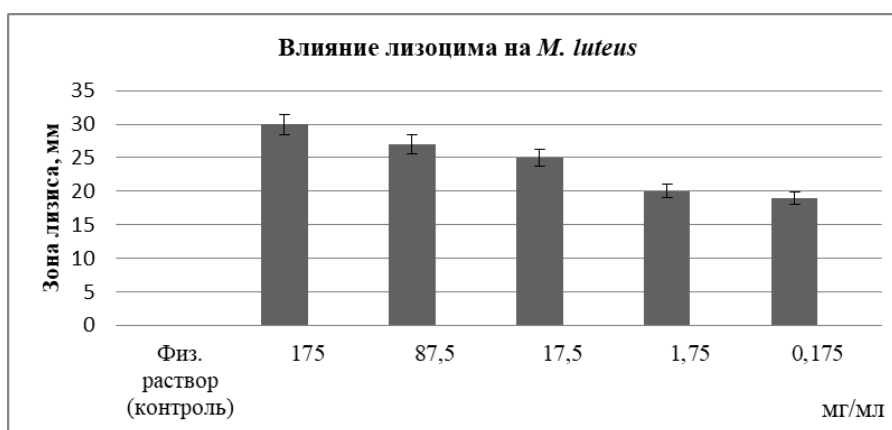
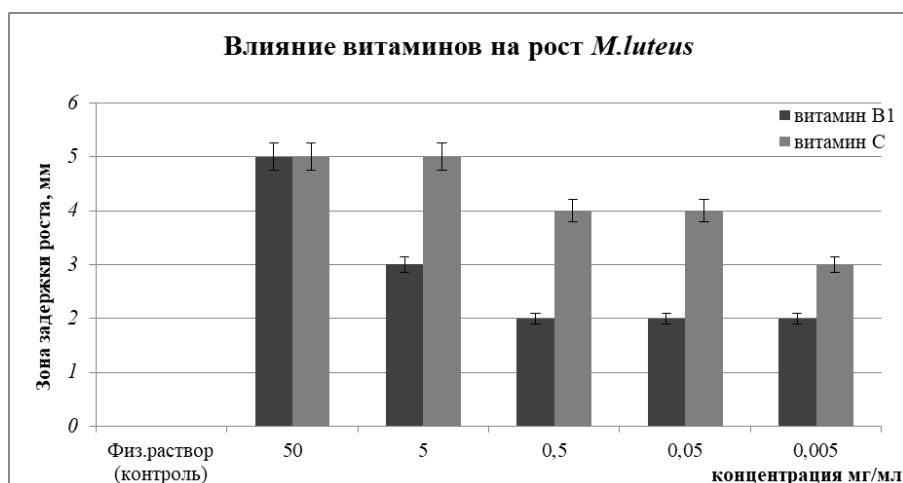


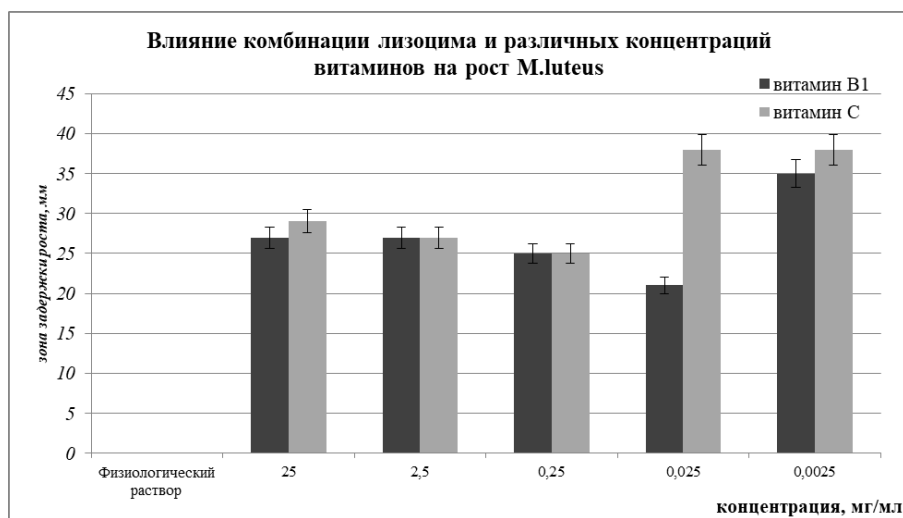
Рисунок 1 - Степень литической активности лизоцима против *M. luteus*  
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92.1>

Полученные данные согласуются с работами Гончаровой А.И. и соавт. (2019) по изучению антимикробной активности лизоцима различного происхождения [6].

Во второй серии экспериментов оценивался непосредственный антибактериальный эффект витаминов и оказалось, что все концентрации витамина В<sub>1</sub> дают зону задержки роста тест культуры *Micrococcus luteus*. С уменьшением концентрации тиамин ингибирующее действие снижалось. Что касается витамина С, то он также задерживал рост микрококка, однако достоверной зависимости диаметра зоны задержки роста культуры от концентрации препарата не было (рисунок 2).

Рисунок 2 - Влияние витаминов на рост *M. luteus*DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92.2>

В третьей серии экспериментов проводили оценку сочетанного действия витаминов с лизоцимом, учитывая, что концентрации исходных действующих веществ уменьшались вдвое, и обнаружили неоднозначный антимикробный эффект лизоцима в зависимости от количественного присутствия витаминов. Анализ результатов показал и однонаправленный вектор действия лизоцима и витаминов на тест-культуру. Усиливающий эффект лизоцима оказывала концентрация тиамина 0,0025 мкг/мл (рисунок 3). Аскорбиновая кислота в концентрациях 0,025 мкг/мл и 0,0025 мкг/мл также усиливала литическое действие лизоцима.

Рисунок 3 - Влияние сочетанного действия витаминов и лизоцима на рост *M. luteus*DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92.3>

Таким образом, синергидное с лизоцимом литическое действие на исследуемый штамм грамположительных микроорганизмов оказывала концентрация тиамина 0,0025 мкг/мл. а аналогичное действие витамина С было зафиксировано в концентрации 0,025 мкг/мл и 0,0025 мкг/мл.

### Обсуждение

Результаты исследования показали, что лизоцим предсказуемо оказывал литическое действие на чувствительную к нему тест-культуру микроорганизмов. Вместе с тем, выяснилось, что и концентрации водорастворимых витаминов B<sub>1</sub> и C при разведении на два и даже три порядка оказывают в эксперименте ингибирующее действие на тест-культуру *Micrococcus luteus*. Обнаруженный антибактериальный эффект витаминов согласуется с известными данными о способности аскорбиновой кислоты (C) и тиамин (B<sub>1</sub>) задерживать рост грамположительных бактерий, а именно, *Staphylococcus aureus* [3], [10]. Совместное использование лизоцима и водорастворимых витаминов B<sub>1</sub> и C, оказывало синергидный антибактериальный эффект, причём более наглядно это проявлялось при комбинации лизоцима с тиамин. Обнаруженный факт укладывается в парадигму одной из стратегий усиления антибактериального эффекта уже известных лекарственных средств сочетанием двух и более биологически активных веществ [1], [7]. Учитывая, что обнаруженный синергидный эффект изучаемые витамины оказывали *in vitro* в концентрациях, превышающих

таковую в организме, перспективным представляется оценить возможность их использования как вспомогательный антибактериальный компонент для наружного применения.

### Заключение

Проведенные исследования показали возможность расширения использования разных концентраций водорастворимых витаминов В<sub>1</sub> и С в сочетании с лизоцимом для эффективной борьбы с бактериальными инфекциями. Это позволяет считать исследование перспективным и даёт основание для проведения дальнейших экспериментов с целью оптимизации схемы практического использования.

### Конфликт интересов

Не указан.

### Рецензия

Кузнецова Н.С., Забайкальский государственный университет, Чита, Российская Федерация  
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92.4>

### Conflict of Interest

None declared.

### Review

Kuznetsova N.S., Transbaikalian State University, Chita, Russian Federation  
DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.133.92.4>

### Список литературы / References

1. Артющкин С.А. Естественные факторы защиты в лечении воспалительных заболеваний глотки и лимфаденоидного глоточного кольца / С.А. Артющкин, Н.В. Еремина // Медицинский совет. — 2017. — № 16. — С. 33-37.
2. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим исследованиям / М.О. Биргер. — М.: Медицина, 1982. — 462 с.
3. Бремер С.М. Витамины / С.М. Бремер. — М.: Медгиз, 1959. — С. 27.
4. Булкина Н.В. Опыт применения аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта / Н.В. Булкина, А.П. Ведяева, Е.В. Токмакова и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2013. — № 3. — С. 372-375.
5. Гаврилова Н.Н. Влияние витаминов на рост и биологическую активность патогенных, условно-патогенных и пробиотических микроорганизмов / Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова, Л.П. Треножникова и др. // Биотехнология. Теория и практика. — 2010. — № 2. — С. 85-92.
6. Гончарова А.И. Антимикробная активность лизоцима как фактор неспецифической резистентности / А.И. Гончарова, В.К. Окулич, В.Ю. Земко и др. // Вестник ВГМУ. — 2019. — № 4. — С. 40-45.
7. Жилкина В.Ю. Изучение антимикробной и антимикотической активности витаминных сборов и препаратов на их основе / В.Ю. Жилкина, Н.П. Сачивкина, А.И. Марахова и др. // Современные проблемы науки и образования. — 2017. — № 5. — С. 124.
8. Калюжин О.В. Антибактериальные, противогрибковые, противовирусные и иммуномодулирующие эффекты лизоцима: от механизмов к фармакологическому применению / О.В. Калюжин // Эффективная фармакотерапия. — 2018. — № 14. — С. 6-13.
9. Кудзоев Т.М. К витаминам — антиоксидантам / Т.М. Кудзоев // Научное обеспечение сельского хозяйства горных и предгорных территорий. — Горский госагроуниверситет, 2021. — С. 93-94.
10. Ракипова И.Р. Изучение влияния синтетических препаратов на биологические свойства микроорганизмов, представителей микробиома человека / И.Р. Ракипова, О.О. Жеребятьева, Е.А. Михайлова и др. // Современные проблемы науки и образования. — 2021. — № 3. — С. 135. — DOI: [10.17513/spno.30844](https://doi.org/10.17513/spno.30844).
11. Ратникова И.А. Влияние витаминов на рост и резистентность к антибиотикам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов / И.А. Ратникова, Н.Н. Гаврилова, К.Б. Баякшьева и др. // Альманах мировой науки. — 2015. — № 1. — С. 28-29.
12. Усенко Д.В. Комбинированная терапия воспалительных заболеваний ротоглотки у детей / Д.В. Усенко, А.В. Горелов // Медицинский совет. — 2016. — № 1. — С. 3-6.
13. Hong J.Y. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicenter Study for Evaluating the Effects of Fixed-Dose Combinations of Vitamin C, Vitamin E, Lysozyme, and Carbazochrome on Gingival Inflammation in Chronic Periodontitis Patients / J.Y. Hong, J.S. Lee, S.H. Choi et al. // BMC Oral Health. — 2019. — № 19(40). — DOI: [10.1186/s12903-019-0728-2](https://doi.org/10.1186/s12903-019-0728-2).
14. Welch C. The Effectiveness of Intravaginal Vitamin C versus Placebo for the Treatment of Bacterial Vaginosis / C. Welch, K. Baker // JBI Database System Rev. Implement. Rep. — 2015. — № 13(6). — P. 96-113.

### Список литературы на английском языке / References in English

1. Artjushkin S.A. Estestvennye faktory zashhity v lechenii vospalitel'nyh zabolevanij glotki i limfadenoidnogo glotochnogo kol'ca [Natural Defence Factors in the Treatment of Inflammatory Diseases of the Pharynx and Lymphadenoid Pharyngeal Ring] / S.A. Artjushkin, N.V. Eremina // Medicinskij sovet [Medical board]. — 2017. — № 16. — P. 33-37. [in Russian]
2. Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim issledovanijam [Handbook of Microbiological and Virological Research] / M.O. Birger. — M.: Medicina, 1982. — 462 p. [in Russian]
3. Bremener S.M. Vitaminy [Vitamins] / S.M. Bremener. — M.: Medgiz, 1959. — P. 27. [in Russian]

4. Bulkina N.V. Opyt primeneniya askorbata hitozana v kompleksnoj terapii zabojevanij parodonta [Experience in the Application of Chitosan Ascorbate in the Complex Therapy of Periodontal Diseases] / N.V. Bulkina, A.P. Vedjaeva, E.V. Tokmakova et al. // Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal [Saratov Research Medical Journal]. — 2013. — № 3. — P. 372-375. [in Russian]
5. Gavrilova N.N. Vlijanie vitaminov na rost i biologicheskuju aktivnost' patogennyh, uslovno-patogennyh i probioticheskih mikroorganizmov [Effect of Vitamins on the Growth and Biological Activity of Pathogenic, Conditionally Pathogenic and Probiotic Microorganisms] / N.N. Gavrilova, I.A. Ratnikova, L.P. Trenochnikova et al. // Biotehnologija. Teorija i praktika [Biotechnology. Theory and Practice]. — 2010. — № 2. — P. 85-92. [in Russian]
6. Goncharova A.I. Antimikrobnaja aktivnost' lizocima kak faktor nespecificheskoj rezistentnosti [Antimicrobial Activity of Lysozyme as a Factor of Nonspecific Resistance] / A.I. Goncharova, V.K. Okulich, V.Ju. Zemko et al. // Vestnik VGMU [Bulletin of VSMU]. — 2019. — № 4. — P. 40-45. [in Russian]
7. Zhilkina V.Ju. Izuchenie antimikrobnoj i antimikoticheskoj aktivnosti vitaminnyh sborov i preparatov na ih osnove [A Study of Antimicrobial and Antimycotic Activity of Vitamin Collections and Preparations Based on Them] / V.Ju. Zhilkina, N.P. Sachivkina, A.I. Marahova et al. // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija [Modern Problems of Science and Education]. — 2017. — № 5. — P. 124. [in Russian]
8. Kaljuzhin O.V. Antibakterial'nye, protivovirusnye i immunomodulirujushhie jeffekty lizocima: ot mehanizmov k farmakologicheskomu primeneniju [Antibacterial, Antifungal, Antiviral and Immunomodulatory Effects of Lysozyme: From Mechanisms to Pharmacological Applications] / O.V. Kaljuzhin // Jeffektivnaja farmakoterapija [Effective Pharmacotherapy]. — 2018. — № 14. — P. 6-13. [in Russian]
9. Kudzoev T.M. K vitaminam — antioksidantam [On Antioxidant Vitamins] / T.M. Kudzoev // Nauchnoe obespechenie sel'skogo hozjajstva gornyh i predgornyh territorij [Scientific support of agriculture in mountainous and foothill areas]. — Gorsky State Agrarian University, 2021. — P. 93-94. [in Russian]
10. Rakipova I.R. Izuchenie vlijanija sinteticheskikh preparatov na biologicheskie svojstva mikroorganizmov, predstavitelej mikrobioma cheloveka [Study of the Effect of Synthetic Preparations on the Biological Properties of Microorganisms, Representatives of the Human Microbiome] / I.R. Rakipova, O.O. Zherebjat'eva, E.A. Mihajlova et al. // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija [Modern Problems of Science and Education]. — 2021. — № 3. — P. 135. — DOI: 10.17513/spno.30844. [in Russian]
11. Ratnikova I.A. Vlijanie vitaminov na rost i rezistentnost' k antibiotikam patogennyh i uslovno-patogennyh mikroorganizmov [Effect of Vitamins on the Growth and Antibiotic Resistance of Pathogenic and Conditionally Pathogenic Microorganisms] / I.A. Ratnikova, N.N. Gavrilova, K.B. Bajakysheva et al. // Al'manah mirovoj nauki [Almanac of World Science]. — 2015. — № 1. — P. 28-29. [in Russian]
12. Usenko D.V. Kombinirovannaja terapija vospalitel'nyh zabojevanij rotoglotki u detej [Combined Therapy of Inflammatory Diseases of the Oropharynx in Children] / D.V. Usenko, A.V. Gorelov // Medicinskij sovet [Medicine Council]. — 2016. — № 1. — P. 3-6. [in Russian]
13. Hong J.Y. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicenter Study for Evaluating the Effects of Fixed-Dose Combinations of Vitamin C, Vitamin E, Lysozyme, and Carbazochrome on Gingival Inflammation in Chronic Periodontitis Patients / J.Y. Hong, J.S. Lee, S.H. Choi et al. // BMC Oral Health. — 2019. — № 19(40). — DOI: 10.1186/s12903-019-0728-2.
14. Welch C. The Effectiveness of Intravaginal Vitamin C versus Placebo for the Treatment of Bacterial Vaginosis / C. Welch, K. Baker // JBI Database System Rev. Implement. Rep. — 2015. — № 13(6). — P. 96-113.