

УДК 615.281:546.131

О. П. Собещук, ст. преп.;
В. Е. Капуцкий, ст.н.сотр.
БГУ;
И. Н. Слабко, мл.н.сотр.
МГМИ;
А. А. Адарченко, гл.н.сотр.
МГМИ

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРНОГО АНТИСЕПТИКА НА ОСНОВЕ ХЛОРГЕКСИДИНА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ

The authors have produced the polymeric antiseptic which is monocarboxylcellulose (MCC) modified with chlorhexidin and they have investigated its antimicrobial properties. Due to improvement of principles and methods of treatment and prevention of purulent-inflammatory of located significance diseases the suggested polymeric antiseptic has a perspective to be used as a medical preparation. The original method of study of its antimicrobial effect has been described.

В условиях широкого распространения множественноустойчивых к антибиотикам вариантов бактерий и связанной с этим малой эффективности антибиотикотерапии и антибиотикопрофилактики предпочтительнее использовать антисептические препараты, к большинству которых возбудители внутрибольничных инфекций сохранили высокий уровень и широкий спектр чувствительности [1].

Важнейшей задачей современной химиотерапии является оптимизация действия лекарственных веществ (ЛВ), которую часто предпочитают даже синтезу новых ЛВ [2]. Целенаправленный транспорт ЛВ в определенные органы, ткани, очаги поражения в оптимальных концентрациях с регулируемой продолжительностью действия может существенным образом повысить их терапевтический эффект. В последние годы началось осуществление этих идей на практике путем разработки различных методов иммобилизации ЛВ на макромолекулярных носителях [2].

Целью нашего исследования явилось получение полимерного антисептика хлоргексидина пролонгированного антимикробного действия с использованием монокарбоксилцеллюлозы (МКЦ) в качестве носителя низкомолекулярного хлоргексидина и изучение его антимикробных свойств.

В настоящее время в странах СНГ фармакопейным препаратом является хлоргексидин биглюконат 20% (ХГБ) и его 0,05%-ный водный или водноспиртовой растворы [3]. В немецкой [4] и европейской [5] фармакопеях представлены, кроме хлоргексидина биглюконата, хорошо растворимого в воде и спирте, две другие солевые формы хлоргексидина: хлоргексидин дигидрохлорид и хлоргексидин диацетат.

Хлоргексидин-основание (ХГ), химическое название которого - 1,1'-гексаметилен - бис [5-(4-хлорфенил) бигуанид], представляет собой бисгуанидиновое аминосодержащее соединение, очень мало растворимое в воде. Как и все свободные амины, ХГ мало устойчив и в присутствии кислорода достаточно быстро претерпевает окислительно-деструктивные превращения, поэтому для медицинского назначения его применяют в виде более устойчивых солевых форм, которые получают путем обработки ХГ-основания кислотами. В табл.1 приведены некоторые свойства ХГ солей.

Таблица 1
Свойства солевых форм хлоргексидина-основания

Солевая форма ХГ	Брутто-формула	Молекулярная масса	Растворимость в воде, мас. %	Растворимость в органических растворителях
ХГ-основание	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2$	505,5	0,008	ацетон-вода; мало раств. в этаноле
ХГ дигидрохлорид	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot 2HCl$	578,4	0,06	пропиленгликоль (1:50); оч. мало раств. в этаноле
ХГ динитрат	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot 2HNO_3$	631,5	0,03	-
ХГ сульфат	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot H_2SO_4$	603,6	0,1	-
ХГ ацетат	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot 2CH_3COOH$	625,6	1,9	этанол, оч. мало раств. в глицерине, пропиленгликоле
ХГ биглюконат	$C_{22}H_{30}N_{10}Cl_2 \cdot 2C_5H_{11}O_5COOH$	898,0	х.р.	ацетон, этанол

Наиболее широко применяется ХГБ 0,05%-ный раствор. При промывании раневых очагов в результате разбавления, резорбции,

связывания раневым отделяемым концентрация ХГ быстро падает и становится меньше минимально подавляющей концентрации (МПК) в течение 1-2 часов.

Нами, путем обработки монокарбоксилцеллюлозы водным раствором ХГ биглюконата, получена ХГ соль МКЦ с различным содержанием связанного ХГ-основания.

Схема получения

МКЦ + ХГ биглюконат \leftrightarrow ХГ соль МКЦ+2-глюконовая кислота

ХГ соль МКЦ является, по существу, полимерным аналогом ХГ биглюконата. МКЦ, химическое название которой - полиангидроглюкуроновая кислота, представляет собой полимерную основу глюкуроновой кислоты. Эта кислота является окисленным производным глюкозы. Глюконовая кислота также является окисленным производным глюкозы.

Для определения чувствительности микробов к антибиотикам и антисептикам существует ряд методов, среди которых наиболее распространены: метод последовательных разведений в жидкой питательной среде или питательном агаре, метод диффузии в агар и ряд ускоренных методов [6].

Проанализировав существующие общепринятые методы определения МПК антибиотиков и низкомолекулярных антисептиков, мы предлагаем модифицированный метод определения МПК для полимерных антисептиков. В его основе лежит метод серийных разведений низкомолекулярного антимикробного препарата (антибиотика) в жидкой питательной среде [6]. Данный метод является стандартным при разработке фармакопейных препаратов.

Предлагаемый нами метод состоит в следующем: полимерный антисептик (ПА) массой 0,1 г в мелкодисперсном состоянии или в виде водного раствора помещали в изотонический раствор объемом 2 мл. После энергичного встряхивания суспензию или раствор объемом 1 мл вносили в пробирку с бульоном такого же объема (1 мл). Из данной пробирки с бульоном в объеме 2 мл после встряхивания отбирали 1 мл бульона и переносили его в следующую пробирку, уже содержащую 1 мл бульона, повторяя эти действия многократно, чтобы получить ряд концентраций ПА, отличающихся друг от друга в 2 раза. В каждую пробирку, содержащую определенную концентрацию ПА, вносили 0,1 мл суточной культуры индикаторного микроорганизма плотностью 10^5 - 10^6 КОЕ/мл. Микробостатическое действие ПА опре-

деляли по отсутствию роста микроорганизмов в пробирке с наименьшей его концентрацией. Она является минимально подавляющей статической концентрацией (МПК статическая). Минимально подавляющую цидную концентрацию (МПК цидная) определяли путем высева из трех последних пробирок с видимым отсутствием роста микроорганизмов (прозрачный бульон) на плотные питательные среды после инкубирования посевов при температуре 37°C. Наименьшая концентрация в пробирке, высев из которой суспензии микроорганизмов на питательную среду не дал роста микробов, считалась МПК цидной.

Колоночный метод изучения продолжительности антимикробного действия полимерного антисептика (нерастворимого в воде) проводили следующим образом: исследуемый ПА в измельченном состоянии в количестве 0,20 г с плотностью набивки около 0,6 г/см³ помещали в стеклянную колонку диаметром 4 - 6 мм, длиной 100-150 мм. Через него с постоянной скоростью примерно 1 мл/мин пропускали изотонический раствор. Пробы отбирали после пропускания через образец раствора с целью определения содержания десорбируемого с препарата ХГ. Порционную пробу объемом 0,08 мл вносили в лунку питательной среды, засеянной типовым штаммом *Staphylococcus aureus* 209p и после 24-часовой инкубации при 37°C измеряли диаметр зон задержки роста микроорганизмов. Содержание ХГ в элюате определяли по калибровочному графику зависимости зоны задержки роста золотистого стафилококка от величины концентрации препарата (0,0025 - 10 мг/мл) в элюате.

Антимикробная активность и спектр антимикробного действия полимерных антисептиков

Результаты определения МПК волокнистых целлюлозных материалов представлены в табл.2. Видно, что полимерный целлюлозный антисептик с химически связанным ХГ обладает большей активностью по сравнению с низкомолекулярным ХГ (табл.3). Так, низкомолекулярный ХГ биглюконат оказывал статическое действие на золотистый стафилококк в концентрации 0,002 мг/мл, а в химически связанном виде с содержанием 1% и 6% ХГ-основания оказывал это же действие в расчете на суспендированный полимерный комплексный образец в концентрациях 0,19 и 0,02 мг/мл; этим концентрациям соответствовали 0,002 и 0,001 мг/мл ХГ-основания. Цидное действие ХГ биглюконат оказывал в концентрации 0,0078 мг/мл, а для ХГ солей МКЦ в приведенном ряду в расчете на суспендированный ПА - в концен-

трациях 0,39 и 0,05 мг/мл; этим концентрациям суспендированного образца соответствовали 0,004 и 0,003 мг/мл содержащегося в нем ХГ. Сравнительные данные по антимикробной активности и спектру антимикробного действия полимерного антисептика (ХГ солей МКЦ) и полимерного антибиотика (ЛК соли МКЦ) представлены в табл.2. Видно, что полимерный антисептик в суспензии оказывает действие для образцов, содержащих 1,0 и 6% ХГ-основания, в интервале 0,39 - 25 мг/мл и 0,012 - 6,25 мг/мл соответственно на все виды микроорганизмов, включая как грамположительные так и грамотрицательные бактерии, бациллы и грибы; при пересчете на содержащийся в образцах ХГ концентрация последнего составляла 0,004 - 0,12 и 0,0007 - 0,4 мг/мл. МПК полимерного антисептика зависит от систематического положения микроорганизмов. Так, для соли МКЦ (6% ХГ-основания) МПК статическая в отношении синегнойной палочки (0,78 мг/мл) на два порядка выше по сравнению с МПК в отношении грибов (0,003 мг/мл). Кишечная палочка более устойчива по сравнению с золотистым стафилококком: ее МПК статическая в 2 раза превышает МПК статическую золотистого стафилококка (0,05 и 0,02 мг/мл) соответственно.

Антимикробная активность низкомолекулярного ХГ биглюконата (табл.3) ниже в отношении тест-культур микроорганизмов по сравнению с полимерным антисептиком (табл.2). Особенно это показательно на примере с грибами. Так, низкомолекулярный ХГ биглюконат подавляет *Candida albicans* ATCC 885652 в концентрациях более 0,25 мг/мл, тогда как в виде ХГ соли МКЦ (6% ХГ-основания) он оказывает статическое действие на этот штамм в суспензионной концентрации 0,003 мг/мл (0,0002 мг/мл ХГ-основания) и цидное - в суспензионной концентрации 0,02 мг/мл (0,001 мг/мл ХГ-основания), значения которых во много раз меньше, чем низкомолекулярного ХГ.

Таким образом, низкомолекулярный ХГ при превращении в полимерное состояние полностью сохраняет первоначальный спектр антимикробного действия, а его активность для некоторых исследованных штаммов даже возрастает.

Таблица 2
Антимикробная активность и спектр антимикробного действия ХГ солей МКЦ, содержащих 0,5 и 6% ХГ-основания, и ЛК соли МКЦ, содержащей 44% ЛК-основания (пленка с линкомицином)

Индикаторные тест-культуры микроорганизмов	МПК статическая (мг/мл) в расчете на						МПК цидная (мг/мл) в расчете на					
	суспендированный образец			содержащиеся в образце ХГ и ЛК			суспендированный образец			содержащиеся в образце ХГ и ЛК		
	1% ХГ	6% ХГ	44% ЛК	1% ХГ	6% ХГ	44% ЛК	1% ХГ	6% ХГ	44% ЛК	1% ХГ	6% ХГ	44% ЛК
	0,19	0,02	0,4	0,002	0,0015	0,17	0,39	0,05	0,4	0,004	0,003	0,17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,19	0,02	0,4	0,002	0,0015	0,17	0,39	0,05	0,4	0,004	0,003	0,17
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	0,80	0,05	0,4	0,008	0,003	0,17	3,12	0,1	12,5	0,03	0,006	5,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	3,12	0,78	< 0,2	0,03	0,05	0,085	12,5	6,25	> 25	0,12	0,4	> 11
<i>Bacillus subtilis</i> N 83	6,20	0,012	0,4	0,06	0,0007	0,17	25	0,012	12,5	0,12	0,0007	> 11
<i>Candida albicans</i> ATCC 88562	0,20	0,003	< 0,2	0,002	0,0002	< 0,08	25	0,02	> 25	0,12	0,001	> 11

**Антимикробная активность и спектр антимикробного действия
хлоргексидина биглюконата (ХГБ) и линкомицина гидрохлорида
(ЛК·НСI)**

Индикаторные тест-культуры микроорганизмов	МПК статическая (мг/мл) для		МПК цидная (мг/мл) для	
	ХГБ	ЛК·НСI	ХГБ	ЛК·НСI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,002	0,02	0,0078	0,1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	0,004	0,2	0,004	1,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	0,015	0,1	0,125	0,75
<i>Bacillus subtilis</i> N 83	0,0078	0,2	0,0078	1,5
<i>Candida albicans</i> ATCC 885652	>0,25	0,006	>0,25	>6

Скорость выделения хлоргексидина из полимерного антисептика (ХГ соль МКЦ, 6% ХГ)

ХГ соль МКЦ оказывает антимикробное действие путем отщепления катионов ХГ в результате реакции ионного обмена с электролитами раствора. Этот химический процесс протекает не мгновенно, а с определенной скоростью. Скорость выделения ХГ из целлюлозного материала определяли следующим образом: монолитный образец в виде нити или устойчивых кусочков ткани (не диспергированной) массой 4 мг помещали в пробирку с 10 мл бульона, энергично встряхивали и после четкого оседания образца на дно пробирки (около 1 мин) анализировали надосадочную жидкость следующим образом: к 1 мл этой жидкости добавляли 0,1 мл взвеси суточной культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и по 0,02 мл высевали на питательную среду. Посевы инкубировали 24 ч при 37°C и учитывали рост микроорганизмов. Опыты показали, что он наблюдался только через 1 и 2 мин в количестве $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/мл и $0,5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл соответственно при посевной дозе в $1,0 \cdot 10^5$ КОЕ/мл; спустя 4 мин и более наблюдалась полная задержка роста микроорганизмов. Это свидетельствует о достаточно быстром выделении молекул ХГ из полимерного антисептика, что важно при его использовании в клинической практике.

Длительность (продолжительность) антимикробного действия полимерных антисептика и антибиотика

Полученные результаты свидетельствуют, что длительность и выраженность антимикробного действия полимерного антисептика зависит от количества ХГ, введенного в полимер. Так, для ХГ солей МКЦ, содержащих 0,2;0,5;2;6;10 % ХГ-основания, антимикробная активность элюата наблюдалась при пропускании 60, 120, 300, 900 и 2000 мл изотонического раствора соответственно.

Длительность антимикробного действия выпускаемой на Борисовском заводе медпрепаратов линкомициновой пленки значительно уступала разработанному нами ХГ-содержащему антисептику. Несмотря на то, что содержание ЛК-основания в линкомициновой пленке в 5-100 раз превышало содержание ХГ-основания в ХГ солях МКЦ, антимикробная активность элюата в случае с линкомициновой пленкой наблюдалась лишь в пропускании 60 мл изотонического раствора. Это свидетельствует о том, что молекулы ЛК связаны с полимерным носителем очень прочной связью и при контакте с электролитами быстро отщепляются и переходят в раствор, в связи с этим лекарственный препарат линкомициновой пленки, по существу, представляет собой очень слабое депо связанного антибиотика.

В связи с этим полимерный антисептик в виде ХГ солей МКЦ представляется более перспективным в качестве антимикробного лекарственного препарата.

Результаты проведенных исследований антимикробных свойств полимерного антисептика в виде ХГ солей МКЦ позволяют сделать следующие выводы:

1. Антимикробная активность полимерного антисептика (хлоргексидиновая соль монокарбоксилцеллюлозы) возрастает по сравнению с низкомолекулярным хлоргексидином, при этом спектр его антибактериального действия сохраняется.

2. Скорость высвобождения хлоргексидина из полимерного антисептика в растворах электролитов с созданием низкой, но достаточно эффективной концентрации (в пределах МПК) довольно велика (около 2 мин), что немаловажно при его использовании в клинической практике.

3. Полимерный антисептик в виде ХГ солей МКЦ обладает пролонгированным антимикробным действием, длительность и выраженность которого зависит от количества введенного в него низкомолекулярного хлоргексидина. Хлоргексидин при этом равномерно высвобо-

ждается в низких концентрациях, находящихся в пределах минимально подавляющих концентраций для широкого спектра микроорганизмов.

4. Пролонгированное антимикробное действие полимерного антисептика в виде ХГ солей МКЦ выражено значительно лучше по сравнению с аналогичным действием лекарственного препарата линкомициновой пленки (ЛК соль МКЦ), у которой из-за быстрого высвобождения линкомицина в больших концентрациях наступает быстрое истощение антибиотика и прекращение антимикробного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Собошук О.П., Адарченко А.А. Сопоставление показателей антибактериальной активности антибиотиков и антисептиков в отношении коагулазоотрицательных стафилококков // Тез. докл. конф. «Актуальные проблемы профилактики внутрибольничных инфекций, дезинфекции и стерилизации». - Мн., 1997. - № 6. - С. 25-27, 35 - 40.
2. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. - М.: Химия, 1986. - 296 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - 10-е изд.-М.: Медицина, 1987. - Ч. 2. - С. 411-412.
4. Deutsches Arzneibuch. 1996.
5. Pharmacopée Européenne. 3-eme Edition. - 1997. - Conseil de l'Europe. Strasbourg. - P. 617-621.
6. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. - М.: Медицина, 1982. - С. 38 - 39.