УДК 616–001.4:615.281

В.А. Андреев[1], В.А. Попов[1], А.К. Хрипунов[2], Н.Г. Венгерович[1], К.Н. Касанов[1], В.Б. Сбойчаков[1]

Антибактериальная активность традиционных и наноантисептиков, перспектива их абсорбции на раневых покрытиях

[1]Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург
[2]Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Резюме. *Показана обоснованность применения антисептиков при гнойно-воспалительных процессах как дополнение к лечению антибиотиками. Отражены основные преимущества использования антисептиков для лечения раневых инфекций перед антибиотиками. Представлена сравнительная характеристика традиционных и новых антисептиков, полученных на основе нанотехнологий. Приведены основные достоинства наноантисептиков. Показано их бактерицидное действие на различные микробы, в том числе на госпитальные штаммы. Исследовано воздействие различных концентраций антисептиков на тестируемые микроорганизмы. Исследована эффективность воздействия на госпитальные штаммы бактерий различных концентраций модифицированного катапола содержащего акриловую и метакриловую кислоту. Показано преимущество использования катапола содержащего акриловую кислоту. Выявлены основные наноантисептики, обладающие наибольшей эффективностью. Отражена перспектива их использования в качестве компонента для раневых покрытий.*

Ключевые слова*: антисептики, наноантисептики, раневые покрытия, катапол, модифицированный катапол, акриловая кислота, метакриловая кислота, арабиногалактан, диоксидин.*

Введение. На современном этапе развития медицины всё большую обеспокоенность вызывает глобальное распространение госпитальных полирезистентных штаммов бактерий. По данным многоцентровых исследований «Резорт» и «Металл», частота продукции госпитальными штаммами беталактамаз расширенного спектра действия в России достигает в некоторых стационарах 50%. Металлобеталактамазопродуцирующие штаммы Pseudomonas aeruginosa, разрушающие не только беталактамы, но и карбапенемы, выявлены в 23 стационарах 9 городов России [11]. Частота выделения метициллинрезистентных штаммов в стационарах Москвы и Санкт-Петербурга достигает 65,9% [10]. Особенно актуальна данная проблема для отделений хирургического профиля, где частота больных с гнойно-деструктивными процессами мягких тканей и их осложнениями составляет 30–35% от общего числа больных [5, 6]. Исходя из этого, в дальнейшем следует ожидать появление стафилококков со сниженной чувствительностью к ванкомицину и панрезистентных неферментирующих бактерий, что ещё больше снизит возможности антибактериальной терапии госпитальных инфекций.

В качестве дополнительных методов профилактики и лечения раневых инфекций является применение в хирургической практике антисептиков и материалов на их основе. Однако к этим веществам предъявляется ряд жёстких требований. Они должны характеризоваться выраженным антимикробным эффектом, не обладать токсическими для макроорганизма свойствами (не вызывать повреждения и значительного раздражения тканей, не задерживать регенеративные процессы и т.д.). Такими свойствами обладают вещества, относящиеся к самым разным группам – окислителям, галогеносодержащим соединениям, детергентам, соединениям тяжелых металлов, спиртам, альдегидам и пр. В настоящее время насчитывается около 100 таких соединений, с успехом применяемых в хирургической практике [2]. Так, применение катапола в комплексном лечении огнестрельных ран в значительной степени снижало риск развития раневой инфекции [9].

Давно с успехом используется в медицине, фармацевтике, косметологии такой антисептик, как пероксид водорода. Этот антисептик при его применении разлагается до кислорода и воды без последующего образования токсических соединений.

Серебро, обладающее низкой токсичностью и отсутствием резистентности к нему большинства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, с успехом применяется как антисептик. Препараты, в которых серебро является единственным действующим веществом, проявляют неодинаковую бактерицидную активность в отношении различной патогенной микрофлоры и стоят довольно дорого. Поэтому проводятся исследования по поиску композиций серебра с другими компонентами, обладающими более высокими бактерицидными свойствами за счёт синергического воздействия. Например, при

совместном использовании пероксида водорода в концентрации 3 мг/дм3 обеззараживающий эффект был получен при концентрации серебра в дозе 0,05 мг/дм3 [3]. Использование минимальных концентраций антисептиков позволяет, с одной стороны, уменьшить их токсическое воздействие на ткани организма, а с другой – снизить себестоимость используемых препаратов.

Важным качеством антисептиков является более медленное по сравнению с антибиотиками появление устойчивых к ним штаммов бактерий. Вместе с тем, ко многим используемым по настоящее время в клинике антисептикам, таким как фурацилин, хлоргексидин, борная кислота и другие, раневая микрофлора выработала значительную устойчивость, что в значительной мере снизило эффективность их использования. Появление резистентности отмечено даже к пероксиду водорода, что связано со способностью ингибировать антисептик выработкой бактериальной каталазы и другими клеточными и внеклеточными метаболитами [14]. Одним из современных способов повышения эффективности применения антисептиков является использование нанотехнологий. Так, использование серебра в виде наноразмерных частиц способно многократно повысить бактерицидный эффект [4].

Вещества в виде наночастиц обладают свойствами, часто радикально отличными от их аналогов в виде макроскопических дисперсий, что позволяет создавать новые фармакологически активные препараты и использовать их в медицине [12]. Помимо антибактериального, использование веществ в наносостоянии позволяет достигать и другие активные лечебные эффекты: иммуномоделирующий, антиоксидантный, дегидратационный а также сорбционный при использовании с соответствующими раневыми покрытиями [1, 13,]. Вместе с тем, большинство антисептиков на основе наноматериалов изучены еще недостаточно.

Цель исследования. Изучить антимикробную активность наноантисептиков (серебро, золото, платина, железо, стабилизированные арабиногалактаном; коллоидные растворы серебра, цинка и меди), традиционных антисептиков (катапол, диоксидин) и нового антисептического препарата – модифицированного катапола.

Материалы и методы. Исследования проводили в соответствии с «Методами испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности» (М., МЗ РФ, 1998) на следующих микроорганизмах – Staphylococcus aureus (штамм ATCC 25923), Escherichia coli (ATCC 25922), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853). После 15-минутной экспозиции соответствующих концентраций этих микроорганизмов антимикробное действие растворов нейтрализовали универсальным нейтрализатором (содержащим твин-80 – 3%, сапонин – 3%, гистидин – 0,1%, цистеин – 0,1%), 0,5% растворами тиосульфата натрия и хлористого натрия (для нейтрализации антисептиков, содержащих Ag). Затем проводили высев на соответствующую плотную среду, используя количественные методы посева. Антисептики считали эффективными при подавлении роста 99,99% колониеобразующих единиц (КОЕ) соответствующих микроорганизмов. Дополнительно определяли размеры зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов различных концентраций и обработанных ими нано-гель-пленок Acetobacter xylinum. Исследование проводили, придерживаясь методики, изложенной в «Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products» (Japanese Industrial Standard). Метод описан для определения бактерицидной активности изделий из текстильного материала, его перевод опубликован во втором английском издании в 2002 г. (Japanese Standards Association /Akasaka, Minato-ku, Tokyo, 107-8440 JAPAN). Посевную дозу готовили, используя стандарт мутности 0,5 по МакФарланду, что соответствует концентрации микроорганизмов $1,5\times10^8$ КОЕ/мл. После посева соответствующих микроорганизмов и аппликации материалов, содержащих антисептики, чашки Петри инкубировали при 37°С. Зоны задержки роста микроорганизмов измеряли с точностью до 0,5 мм.

Результаты и их обсуждение. Первую группу исследованных препаратов составили неорганноорганические нанобиокомпозиты, содержащие металлы – серебро, золото, платину и железо, стабилизированные арабиногалактаном. Вторая группа препаратов включала коллоидные растворы серебра, цинка и меди, стабилизация которых была осуществлена путём адсорбции наночастицами положительно заряженных ионов металлов. В результате происходило образование нанокластеров, которые удерживаются в жидкости, не переходя в донную фазу за счёт теплового движения молекул воды. Третью группу составили комплексы ПВП-нано-Ag0 (повиаргол) и ПВП-нано-Se0 (селенопол), представляющие собой наночастицы нуль-валентного серебра и селена, стабилизированные ПВП. Концентрации исследуемых препаратов в растворах были выбраны в соответствии с рекомендациями производителей (0,5, 1,0, 3,0% диоксидин; 2,5% катапол; 2,5% повиаргол; 0,5% селенопол; коллоидные растворы: 0,15% Ag0; 2,15% Zn0; 1,7% Cu0; растворы металлов, стабилизированные арабиногалактаном: 2,5% Ag0; 0,03 и 2,5% Au0; 0,01 и 2,5% Fe0; 0,028 и 2,5% Pt0; 0,1% фуллерен С60, ковалентно связанный с ПВП; 0,3% водная дисперсия шунгитового углерода (ШУ).

Исследовали также комбинированный препарат на основе концентрата антимикробного средства «Ардезин», содержащего 50% пероксида водорода и 750 мг/дм3 серебра в виде комплексных ионов с винной кислотой. С помощью восстановителя, введенного в этот препарат, ионное серебро частично было пере-

ведено в нанокристаллическое, что зафиксировано по появлению оптического эффекта Тиндаля в прозрачном растворе. Препараты сравнивали с традиционными антисептиками – диоксидином, катаполом и модифицированным катаполом (МК). Последний был разработан в Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург) и представляет антисептический комплекс, из состава которого был исключён поливинилпирролидон (ПВП).

Исходный антисептик – катапол – является сополимером ПВП с кротоновой кислотой и катамином Б (антисептик – диметилалкилбензиламмоний хлорид). Сополимер при этом способствует пролонгированному действию препарата. Вместе с тем, включение ПВП в лекарственные композиции нежелательно в связи с агрессивным воздействием на ткани организма [8]. В модифицированном катаполе вместо ПВП была использована 2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкоза, а вместо кротоновой кислоты – акриловая или метакриловая кислота. Результаты исследования антибактериальной активности представлены в таблице 1.

Чувствительность микроорганизмов к двум модифицированным формам катапола (с акриловой – МК-А и метакриловой – МК-М кислотами) с определением оптимальной антимикробной концентрации МК в сравнении с катаполом была исследована на госпитальных штаммах, выделенных из ран пострадавших и больных, находившихся на лечении в клинике военно-полевой хирургии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова: S. aureus, P. aeruginosa, Acinetobacter baumannii. Эти бактерии представляли группу наиболее часто выделяемых возбудителей гнойно-воспалительных инфекций. Общее количество наблюдений составило 158 (табл. 2).

Показано, что МК-А обладал наиболее высокой антимикробной активностью к исследованным штаммам в концентрации 1,5%. МК-М также оказался наиболее эффективен в концентрации 1,5%, однако в меньшей степени по сравнению с МК-А. Предшественник МК – катапол более эффективно подавлял рост синегнойной палочки, но в остальных случаях эффективность его воздействия на рост бактерий оказалась более низкой, что, вероятно, связано с повышением резистентности к нему исследованных госпитальных штаммов.

Установлено, что модифицированный катапол может быть использован в качестве антисептического компонента для раневых покрытий, причём наибольшей эффективностью обладает 1,5% раствор, содержащий в своей структуре акриловую кислоту [13]. Кроме того, исследована антимикробная активность 4-х различных концентраций аргентарабиногалактана: 0,1, 0,25, 0,75, 1,5, 2,5, 3,0%. Растворы предварительно сорбировали на нано-гель-плёнках бактериальной целлюлозы. Выявлено, что по отно-

Таблица 1

Антибактериальная активность антисептиков

Препарат	Концентрация, %	Эффективность обеззараживания при различных концентрациях растворов антисептиков, %		
		S. aureus ATCC 29212	P. aeruginosa ATCC 27853	E. coli ATCC 25922
Диоксидин	1	99,99	99,99	29,6±2,70
Диоксидин	0,5	99,99	99,99	34,3±1,53
Диоксидин	3	99,99	99,99	30,2±1,98
Катапол	2,5	99,99	99,99	34,5±1,37
Повиаргол	2,5	99,99	94,0	99,99
Селенопол	0,5	99,99	98,0	99,99
Ag0	0,15	90,99	96,0	98,0
Cu0	1,7	10,0	15,0	55,0
Zn0	2,15	21,0	10,0	28,0
Ag0 на основе Ардезина	0,1 мас	10,0	55,0	60,0
Ag0 на основе Ардезина	0,25 мас	99,99	99,99	99,99
Fe0 (арабиногалактан)	0,01 и 2,5	6,0	8,0	8.0
Pt0 (арабиногалактан)	0,028 и 2,5	8,0	10,0	8,0
C60/ПВП	0,1	6,0	8,0	8,0
ШУ	0,3	4,0	6,0	4,0
МК-А (с акриловой кислотой)	1,5	99,99	99,99	99,99
МК-А (с метакриловой кислотой)	1,5	99,99	99,99	99,99

Таблица 2

Оценка эффективности антимикробного действия различных концентраций модифицированных форм катапола на госпитальные штаммы микроорганизмов, по зонам задержки роста (мм; X±σ)

Препарат	Концентрация,%	Исследованные штаммы микроорганизмов		
		S. aureus	P. aeruginosa	Acinetobacter baumannii
МК-А	2,0	29,9±1,51	26,5±2,04	40±2,11
МК-А	1,5	39,9±1,52	25,0±1,6	39,9±1,44
МК-А	1,0	24,0±2,03	23,2±2,25	20,4±2,97
МК-А	0,5	22,8±1,36	22,7±2,05	20,3±3,03
МК-М	2,0	21,8±3,55	28,1±1,59	19,9±1,61
МК-М	1,5%	34,3±1,49	24,6±1,83	20,4±1,10
МК-М	1,0	24,1±2,22	20,4±2,80	24,6±1,95
МК-М	0,5	23,76±2,08	20,0±2,99	20,2±2,44
Катапол	2,0%	24,1±2,16	29,7±1,46	30,2±2,43
Катапол	1,5	21,4±1,78	29,9±2,17	28,3±2,18
Катапол	1,0	20,3±4,12	27,2±3,34	27,8±2,70
Катапол	0,5	20,1±2,86	19,9±2,53	24,9±2,27

Таблица 3

Сравнительная характеристика антимикробного действия антисептиков, сорбированных нано-гель-плёнкой целлюлозы Acetobacter xylinum, на госпитальные штаммы микроорганизмов по зонам задержки роста (мм; X±σ)

Госпитальный Штамм	Препарат			
	Диоксидин 1%	Аргентарабиногалактан 2,5%	Катапол 2,5%	МК-А 1,5%
Klebsiella pneumoniae	34,6±1,69	20,6±1,50	29,3±2,20	33,1±1,76
S. aureus	34,3±1,27	33,6±1,57	19,4±1,83	36,9±2,18
P. aeruginosa	34,3±1,24	22,9±2,66	14,5±1,75	24,8±1,93
Ассоциация микроорганизмов	32,6±2,96	25,1±1,37	24,0±2,26	30,1±1,31

шению к исследуемым штаммам микроорганизмов наиболее эффективным оказался 2,5% раствор аргентарабиногалактана.

Растворы, проявившие максимальную антимикробную активность сорбировали нано-гель-плёнкой целлюлозы Acetobacter xylinum и изучали на госпитальных штаммах по зонам задержки роста (табл. 3).

Установлено повышение резистентности госпитальных штаммов *S. aureus* и *P. aeruginosa* к 2,5% раствора катапола, что, вероятно, связано с достаточно длительным применением его в клинике для местного лечения ран. Наиболее эффективными оказались образцы нано-гель-плёнок бактериальной целлюлозы, содержащие 1% раствор диоксидина и 1,5% раствор МК-А (рис. 1).

Зафиксировано повышение резистентности исследованных госпитальных штаммов (особенно S. aureus) к 2,5% раствору катапола. Раствор серебра, стабилизированный арабиногалактаном, менее эффективно подавлял рост *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

Выводы

1. Нано-гель-плёнки бактериальной целлюлозы с иммобилизованными на них антисептическими препаратами – 2,5% раствор аргентарабиногалактана, 2,5% раствор катапола, 1% раствор диоксидина и 1,5% раствор модифицированного катапола могут быть использованы в качестве матрицы биоактивных раневых покрытий.

2. Модифицированный катапол, содержащий в своем составе акриловую кислоту, перспективен как для использования в качестве антисептического компонента раневых покрытий, так и для обработки ран на догоспитальном этапе медицинской эвакуации. Наибольшей эффективностью обладает его 1,5% раствор.

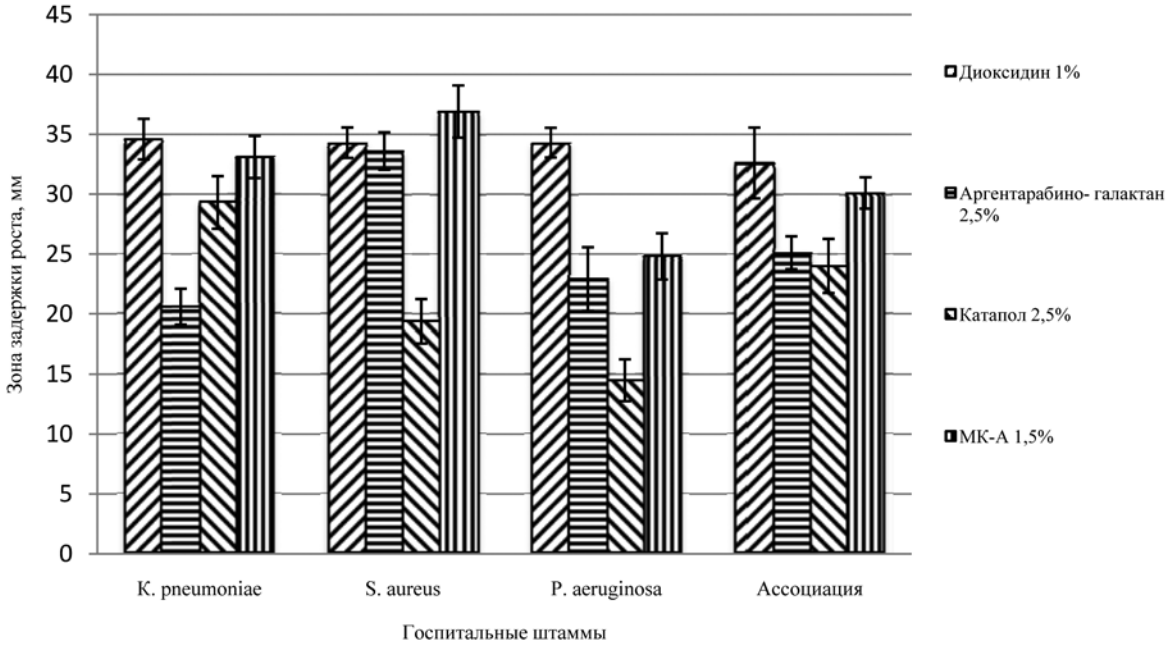

Рис. 1. Антибактериальная активность препаратов нано-гель-плёнки бактериальной целлюлозы с абсорбцией на ней антисептиков

Литература

1. Венгерович, Н.Г. Патогенетическое обоснование биоактивных наноматериалов при раневом процессе: дис. … канд. мед. наук / Н.Г. Венгерович – СПб.: ВМА, 2011. – 151 с.
2. Горюнов, С.В. Гнойная хирургия: атлас / С.В. Горюнов, Д.В. Ромашов, И.А. Бутивщенко. – М.: БИНОМ, 2004. – 558 с.
3. Интенсификация процессов обеззараживания воды, под ред. Л.А. Кульского. – Киев: Наукова думка, 1978. – 96 с.
4. Крутяков, Ю.А., Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы. / Ю.А. Крутяков [и др.] // Успехи химии. – 2008, – Т. 77. – С. 242.
5. Лещенко, И.Г. Гнойная хирургическая инфекция / И.Г. Лещенко, Р.А. Галкин. – Самара, 2003. – 189 с.
6. Толстых, М.П. Теоретические и практические аспекты заживления ран / М.П. Толстых, О.Э. Луцевич – М.: Дипак, 2007. – 96 с.
7. Патент на изобретение «Антисептическое средство» №2446808 МПК 8А61 К 31/78, опубл. 10.04.2012 г. Авторы: Венгерович Н.Г., Хрипунов А.К., Андреев В.А и др.
8. Попов, В.А. Морфофункциональные изменения во внутренних органах экспериментальных животных при внутрибрюшинном введении комплекса С60 с N-поливинилпирролидоном / В.А. Попов [и др.] – Вест. Росс. воен.-мед. академии. – Прилож. – 2008. – № 3 (23). – С. 484.
9. Попов, В.А. Физиологические основы военно-полевой и неотложной хирургии / В.А. Попов. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. – 304 с.
10. Сидоренко, С.В. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге / С.В. Сидоренко [и др.] // Антибиотики и химиотерапия, 1998. – № 7. – С.15–25.
11. Шевченко, О.В. Металлобеталактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий / О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, М.Н. Степанова // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2007. – Т 9, № 3. – С. 20–25.
12. Borm, P.J. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC / P.J. Borm [et al.] // Particle Fibre Toxic. – 2006. – Vol. 3. – P. 11–35.
123. Lin, Y.L. Light-independent inactivation of dengue-2 virus by carboxyfullerene C3 isomer / Y.L. Lin [et al] // Virology. – 2000. – Vol. 275. – P. 258–262.
14. Visick, J. E. RpoS- and OxyR-independent induction of HPI catalase at stationary phase in Escherichia coli and identification of rpoS mutations in common laboratory strains J.E. Visick, S/ Clarke // J. bacteriol. – 1997. – Vol. 13, № 179. – P. 4158–4163.

V.A. Andreev, V.A. Popov, A.K. Hripunov, N.G. Vengerovich, K.N. Kasanov, V.B. Sboychacov

Antibacterial activity traditional and nanoantiseptics, prospect of their absorption on wound coatings

Abstract. *Validity of application of antiseptics is shown at pyoinflammatory processes as addition to treatment by antibiotics. The basic advantages of use of antiseptics to treatment wound infection contaminations before antibiotics are reflected. The relative characteristic of traditional and new antiseptics received on a basis nanotechnology is present. The basic advantages nanoantiseptic are resulted. Their bactericidal action on various bacteria, including on hospital strains is shown. Influence of various concentrations of antiseptics on tested microorganisms is investigated. Efficacy of influence on hospital strains bacteria of various concentrations modified catapol containing acrylic and metacrilic acid is investigated. Advantage of use catapol containing acrylic acid is shown. The cores nanoantiseptics possessing the greatest efficacy are revealed. The prospect of their use as a component for wound coatings is reflected.*

Key words*: antiseptics, nanoantiseptics, wound coatings, catapol, modified catapol, acrylic acid, metacrylic acid, arabinogalactan, diocksidin.*

Контактный телефон: +7-911-913-62-63; e-mail: nickolai@vengerovich.ru