**УДК 544.016**

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТРИКЛОЗАНА И ХЛОРГЕКСИДИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ**

*PhD докторант Савденбекова Б.Е.\*, д.х.н., проф. Оспанова А.К.\*,
д.х.н., проф. Омарова Р.А.\*\*, к.м.н, доцент Искакова М.К.\*\*,
д.м.н, проф. Жартыбаев Р.Н.\*\**

* *\*Казахский Национальный университет им. аль-Фараби,*
* *г. Алматы, Республика Казахстан*

*\*\*Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,*

*г. Алматы, Республика Казахстан*

Проведены физико-химические исследования получения мультислоев на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы, обоснованы применения триклозана и хлоргексидина в качестве антибактериальных агентов для нанопокрытий на кремневых пластинках. Исследование антибактериальной активности полученных мультислоев показали хорошую активность по отношению ко многим бактериям.

**Актуальность проблемы**

Микро и наноразмерные полислои, полученные различными методами из биосовместимых полиэлектролитов из года в год находят широкое применение в фармации, генной инженерии и многих других областях.

Синтез нанослоёв на поверхности блочных и дисперсных подложек является, как известно, одним из перспективных способов получения новых функциональных материалов, в частности антибактериальных пленок, катализаторов, сорбентов, кондуктометрических газовых сенсоров и материалов наноионики. Особое значение среди методов синтеза таких слоёв занимают методы, которые дают возможность выполнять синтез по методике слой-за-слоем в условиях мягкой химии, поскольку при таком синтезе существует возможность прецизионно регулировать толщину слоёв и тем самым получать мультислои, состоящие из отдельных слоёв различного химического состава. Результаты работ в этой области обобщены в монографии [1] и обзорах, например [2], в которых описаны исследования по синтезу c использованием в качестве реагентов молекул, ионов и коллоидных частиц.

С целью продления жизни, улучшения ее качества и увеличения продолжительности закономерно возникла необходимость в проведении оперативных вмешательств по восстановлению или замене поврежденных органов и тканей при травмах, для чего необходимы качественные имплантаты, важными характеристиками которых являются безопасность для человека и длительный срок эксплуатации.

Если в мире в 2002 г. в имплантатах нуждались 4,9 млн человек, то в 2010 г. их количество возросло до 39,7 млн [3]. Только в Англии и Уэльсе в 2010 г. было проведено 166 тыс. операций на бедре и коленном суставе, для сравнения: в 2009 г. их было 114497, а в 2008 г. — 109825 [4]. Искусственные биоматериалы позволяют решить проблему восстановления утраченных органом функций [5]. Существующая средняя продолжительность срока эксплуатации имплантата в 15 лет больше не устраивает ни население, ни систему здравоохранения. Старение населения и задачи здравоохранения по улучшению качества жизни обуславливают необходимость 30–40-летнего срока эксплуатации имплантатов. Возрастающие запросы практического здравоохранения стимулируют проведение научных исследований. Проведение подобных исследований становится возможным благодаря достижениям как в научном направлении так и в практическом [6].

Современное медицинское материаловедение включает разработку и исследование материалов, которые применяются в медицине, создаются с целью компенсации утраты органов или тканей имплантаты особого типа, получением на их поверхности антимикробных и антибактериальных покрытий.

Одним из наиболее перспективным в научном и прикладном отношении разновидностей антибактериальных покрытий, являются тонкие полимерные пленки, нанесенные на поверхности имплантатов, которые могут высвобождать биологические активные вещества в ответ на появление колоний бактерий.

В связи с этим, в данной статье представлены результаты физико-химических основ получения мультислоев на основе хитазана и крабоксиметилцеллюлозы натрия, нанесенных на кремневые пластинки и содержащие в полислоях такие антибактериальные агенты, как триклозан и хлоргексидин.

**Материалы и методы**

Методы проведения исследований - метод мультислойной сборки (LBL).

Потенциометрические, кондуктометрические и вискозиметрические методы исследования процессов взаимодействия проводили в классическом режиме.

Структура поверхностей была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). СЭМ изображения были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Auriga. Кремниевые пластины были прикреплены к стойке СЭМ с проводящей лентой. Сплав Au-Pt был распылен на поверхности образцов из
RF-плазменной камеры в течение 10 секунд. Приложенное напряжение варьировалось от 1 до 3 кВ.

Шероховатость и толщина пленок определяли на профилометре фирмы Alpha-Step
D-500 Stylus Profiler. В качестве тест культур использовали: Staphylococcus aureus АТСС29213, Esherichia coli АТСС25922, Klebsiella pneumonia ATCC700603, (ATCC - Американская коллекция типовых культур) и Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans (дикие штаммы).

Чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтон и Сабуро агар. Стерильный физиологический раствор (0,85%). Стандарт мутности по МакФарланду (0,5ЕД мутности).

Определение бактерицидной и фунгицидной активности, оценка качественных показателей антибактериальных материалов проведены в соответствии со стандартными методиками и требованиями ГФРК.

Все растворы полиэлектролитов, солей использовались марки «х.ч.». Исходная концентрация карабаксиметилцеллюлозы натрия – 0,06 моль/л, хитозана 0,06моль/л, рН 8,5. Исходные концентрации водных растворов анитимикробных реагентов 10-3 моль/л.

**Результаты исследований и их обсуждение**

В работе в качестве полимерных матриц для получения мультислоев были использованы полиэлектролиты хитозан и карбоксиметилцеллюлоза натрия. Выбор этих реагентов связан с тем, что они являются хорошими биосовместимыми, не токсичными для организма веществами. Для установления оптимальных условий получения мультислоев на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы натрия были исследованы процессы их взаимодействия с антибактериальными агентами.

Физико-химическое исследование взаимодействие хитозана с триклозаном было изучено потенциометрическим методом в зависимости от рН среды в области температуры человеческого тела.

До соотношения хитозан:триклозан 1:1 в растворах все характеристики практически не меняются, однако при значительных избытках антибактериального препарата наблюдается появление осадка. Это происходит в области высоких рН, где согласно предварительным исследованиям может выпасть в осадок сам триклозан.

Изменение температуры от 30 до 40 оС незначительно изменяет рН систем с участием хитозана и триклозана, ионная сила раствора и вязкость практически не влияет на формы нахождения реагентов в системе в этой области температур, так как не наблюдается какие-либо фазовые изменения.

Ранее нами было квантово-химическими расчетами обоснованы потенциальные активные центры взаимодействия триклозана с полимерными матрицами мультислоев [11]. В частности, значительные зарядовые характеристики на атомах хлора и кислорода указывают на их хорошую реакционную способность, при чем, атомы кислорода являются наиболее вероятными центрами электрофильной атаки. Кроме того, анализ энергий граничных орбиталей ВЗМО и НСМО (ЕВЗМО - ЕНСМО) показывает, что для молекулы триклазана характерны орбитально-контролируемые процессы, а отрицательный знак энергии НСМО для молекулы триклозана позволяет охарактеризовать его как электрофильного реагента, поэтому для него наиболее характерны процессы принятия «чужих» электронов на наинизшие вакантные (свободные) орбитали.

На основании этих данных можно предположить, что взаимодействие идет за счет амино-группы хитозана и атомами хлора или кислорода гидроксильной группы триклозана.

Далее были изучены также процессы взаимодействия карбоксиметиллцеллюлозы натрия с антибактериальным агентом – триклозаном. С этой целью были приготовлены двухкомпонентные системы КМЦ:триклоазан при различном их соотношении, температуры, ионной силы растворов и измерены рН.

Результаты этих исследований однозначно позволили установить, что карбоксиметилцеллюлоза с триклозаном не образует осадка, и поэтому этот антибактериальный препарат может быть зафиксирован на поверхности карбоксиметилцеллюлозы при получении мультислоев. Кроме того, при температуре человеческого тела в интервале 35-40 0С каких-либо существенных изменений не наблюдалось, что тоже наиболее важный фактор при создании антибактериальных покрытий. Между реагентами может быть только образование интерполимерного комплекса за счет электростатического взаимодействия активных центров триклозана и функциональных групп карбоксиметилцеллюлозы натрия или за счет водородных связей обоих компонентов. Предварительно были исследованы так же процессы возможного взаимодействия карбоксиметилцеллюлозы и хитозана в интервале температур человеческого тела. С этой целью были составлены различные соотношения хитозана и КМЦ натрия и измерены оптические плотности смесей при температуре 38 0С, рисунок 1

 

Рисунок 1- Зависимость оптической плотности смеси хитазан : КМЦ от рН раствора и их состава при температуре 38 0С

Как показали результаты исследований, между хитозаном и КМЦ натрия происходит взаимодействие в области рН 4,2-4,4. Характер взаимодействия, вероятно, носит чисто электростатический характер, хотя не исключается образования комплекса за счет водородных и гидрофобных связей, как было установлено авторами [12] при получении мультислоев с другими полиэлектролитами.

Механизм образования бислоев в полислоях можно объяснить появлением положительного заряда на хитозане и отрицательного – на поверхности молекул КМЦ следующим образом. При обработке пластин с КМЦ-Na щелочным буферным раствором
молекулы натрия вымываются гидроксил ионами и молекулы КМЦ заряжаются отрицательно. При обработке пластин с хитозаном кислым буферным раствором его молекулы заряжаются положительно, так как хитозан притягивает к себе протоны водорода (Н+). Схему появления зарядов на поверхности молекул этих соединений можно предположить следующим образом, рисунок 2.

|  |
| --- |
| C:\Users\aliya4\Pictures\xcx.png |
| Рисунок 2 - Взаимодействие полиэлектролитов с буферными растворами |

Таким образом, механизм получения бислоев в мультислоях между хитазаном и карбоксиметицеллюлозой можно представить по следующей схеме, рисунок 3.



Рисунок 3 - Схема получения мультслоев на основе хитазана и карбоксиметицеллюлозой натрия.

Продолжением дальнейших исследований было изучение зависимости толщины и шероховатости покрытий от числа бислоев, рисунок 4-5. Толщина покрытий линейно заисит от числа мультислоев, причем на самых ближних к пластинке слоях связь чисто, видимо, электростатическая, а по мере роста слоев в образовании мультислоев играют большую роль еще и чисто водородные связи. Шероховатость поверхностей полученных нанопленок увеличивается с ростом числа пленок, что связано с увеличением функциональных групп обоих реагентов [13].

****

Рисунок 4 - Зависимость толщины покрытий от числа билоев для системы
хитозан-КМЦ натрия

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\user\Desktop\с глутарьь.png | C:\Users\user\Desktop\без глутарь.png |

 а) б)

Рисунок 5 - Толщина пленок на кремневой пластинке а) -15 бислоев, б) – 30 бислоев.

Результаты показали, что ионная сила раствора и рН среды значительно изменяют внешние признаки мультслоев и поэтому получения антибактериальных покрытий нужно в строгом соответствии с формой нахождения полиэлектролитов от рН среды (промывка буферными растворами).

Для связывания биологически активных соединений, полученные вышеописанным способом мультислойные пленки погружались в растворы антибактериальных агентов, концентрации (0,05 моль/л) в воде при рН 2-3 в течение 12-14 часов. Кроме триклозана были для сравнения взяты хдоргексидин, азотнокислое серебро и йодсодержащие препараты. После насыщения пленок антибактериальными агентами пленки сушатся при температуре 100-110 0С. Термообработанные пленки далее сшиваются в растворе глутаральдегида при комнатной температуре и сушатся в токе азота.

Таким образом, с учетом полученных экспериментальных данных, были разработаны и обоснованы оптимальные условия получения мультислоев на основе хитозана и КМЦ натрия с антибактериальными агентами, получены и исследованы их свойства на антибактериальную активность на базе научной клинико-диагностической лаборатории КазНМУ имени С. Д. Асфендиярова.

Определение бактерицидной и фунгицидной активности, оценка качественных показателей кремневых пластинок с анитбактериальными покрытиями проведены в соответствии со стандартными методиками и требованиями ГФ РК.

Определение антимикробной активности кремневых пластинок с антибактериальными покрытиями основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводили методом диффузии в агар-агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов определенных концентраций.

В стерильные чашки Петри наливали по 20 мл питательного агара. Толщина агарового слоя влияет на результаты определения, поэтому строго соблюдали указанное количество питательной среды. В качестве питательных сред применяли среду Мюллера-Хинтон и Сабуро агар.

Для получения газонов приготовили гомогенную суспензию бактериальных клеток в физиологическом растворе, соответствующую стандарту 0,5ЕД мутности по МакФарланду. Бактериальную взвесь нанесли стерильным тампоном на поверхность агара в трех различных направлениях. Через 5 – 10 минут после инокулирования на подсохшую поверхность агара нанесли пластинки с антимикробными свойствами.

Чашки в течение 30 минут оставляли при комнатной температуре, а затем, не переворачивая, инкубировали в термостате при температуре 28-37 0С 24-48 ч. до 5 суток. Зоны угнетения микробного роста измеряли миллиметровой линейкой. Результаты этих исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1 **-** Изучение антимикробной активности методом диффузии

|  |  |
| --- | --- |
| **Исследуемые материал** | **Зона задержки роста/мм** |
| E. сoliАТСС25922 | S. aureusАТСС29213 | K. pneumonia ATCC700603 | Paeruginosa | C. albicans |
| СП  –30 слой AgNO3 | 20мм | 10мм | 6мм | 18мм | 0 |
| СП  – 40 слой AgNO3 | 22мм | 7мм | 3мм | 11мм | 0 |
| СП  – AgNO3 | 16мм | 7мм | 5мм | 10мм | 0 |
| СП  – 10 слой Йода  | 20мм | 8мм | 6мм | 20мм | 0 |
| СП – 30 слой KI | 20мм | 8мм | 4мм | 11мм | 0 |
| СП  –40 слой KI  | 20мм | 10мм | 5мм | 15мм | 0 |
| СП  – 40 слой Хитозан | 16мм | 10мм | 2мм | 12мм | 0 |
| СП –30 слой Хлоргексидин | 14мм | 10мм | 4мм | 14мм | 0 |
| СП – 40 слой Хлоргексидин | 20мм | 15мм | 7мм | 19мм | 0 |
| СП– 40 слой Триклозан | 22мм | 10мм | 8мм | 17мм | 0 |
| СП– 10 слой Триклозан | 18мм | 8мм | 4мм | 11мм | 0 |
| СП– 30 слой Триклозан | 18мм | 10мм | 4мм | 12мм | 0 |

Изучение антимикробной активности пластинок методом диффузии показало, что все изучаемые стоматологические пластины имели противобактериальный эффект в отношении музейного штамма E. сoli АТСС25922 и дикого штамма P. aeruginosa; при этом наиболее действующим (с бóльшей зоной задержки роста бактерии) на изучаемые музейные и дикие штаммы бактерии оказались пластины с Триклозаном, проявив чувствительность к E. сoli АТСС25922 и P. aeruginosa; далее противобактериальным действием обладали пластины с Хлоргексидином, ингибировав рост E. сoli АТСС25922, и P. aeruginosa, при этом пластина СП – 40 слой с Хлоргексидином ингибировала рост S. aureus АТСС29213. Стоматологические пластины с нитратом серебра противобактериальный эффект проявили в отношении E. сoli АТСС25922, пластина 30-слойная AgNO3 повлияла также на P. aeruginosa. Пластина с йодом также подействовала большой зоной задержки роста на E. сoli АТСС25922 и P. aeruginosa, влияние на микроорганизмы пластин с калием и хитозаном было примерно одинаково – с эффектом противобактериального действия на E. сoli АТСС25922 и со средним действием (11-15 мм) на P. aeruginosa.При этом пластина с 1 КМЦ оказалась действующей только на E. сoli АТСС25922.

Проведенные испытания показали хорошую антибактериальную активность мультислоев, зафиксированных на кремневых пластинках, что указывает на перспективность таких исследований.

**Заключение**

Проведено физико-химическое обоснование применения хитозана и карбоксиметилцеллюлозы натрия для получения мультислоев методом LBL на поверхности кремневых пластинок. Установлен механизм образования бислоев на основании хитозана и карбоксиметицеллюлозы натрия в зависимости от рН среды, предложена схема формирования мультислоев на поверхности кремневых пластинок, обосновано включение триклозана на поверхность нанопокрытий. Полученные пленки с антибактериальными агентами показали хорошую активность по отношению ко многим бактериям.

**Список литературы**

1 Decher G., Schlenoff J. B. Multilayer Thin Films. N.-Y.: Wiley-VCH, 2003.

2 Xi Zhang, Huan Chen, Hongyu Zhang. Layer-by-layer assembly: from conventional to unconventional methods // Chem. Commun. 2007. P. 1395.

3 Ariga K., Hill J. P., Qingmin Ji. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application // Phys. Chem. Chem. Phys. 2007. N 9. P. 2319.

4 Толстой В. П. Синтез тонкослойных структур методом ионного наслаивания
// Усп. химии. 1993. Т. 62. C. 260.

5 Толстой В. П. Реакции ионного наслаивания. Применение в нанотехнологии // Усп. химии. 2006. Т. 75. № 2. С. 183.

6 Толстой В. П. Синтез слоёв нанокомпозита SnO2–Aux0-(H3PW12O40)y · nH2O на поверхности кремнезёма по методике ≪слой-за-слоем≫ // Журн. орган. химии. 2009. Т. 79. № 12.С. 1952.

**ХИТОЗАН ЖӘНЕ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗ НЕГІЗІНДЕ АНТИБАКТЕРИАЛДЫ ЖАБЫНДЫ АЛУ ҮШІН ТРИКЛОЗАН МЕН ХЛОРГЕКСИДИННІҢ ҚОЛДАНЫЛУЫНЫҢ ФИЗИКАЛЫҚ-ХИМИЯЛЫҚ НЕГІЗІ**

*PhD докторант Савденбекова Б.Е.\*, х.ғ.д., проф. Оспанова А.К.\*,
х.ғ.д., проф. Омарова Р.А.\*\*, м.ғ.к, доцент Искакова М.К.\*\*,
м.ғ.д, проф. Жартыбаев Р.Н.\*\**

*\*Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан*

*\*\*С.Д. Асфендиров атындағы Қазақ ұлттық медициналық университеті,
Алматы қ., Қазақстан*

Хитозан мен карбоксиметилцеллюлоза негізінде мультиқабаттарды алудың физикалық-химиялық зерттеуі жүргізілген, кремнилі төсемшелерде наножабындар үшін антибактериалды агент ретінде триклозан мен хлоргексидиннің қолданылуы негізделген. Зерттеулер көптеген бактериаларға қатысты алынған мультиқабаттар айтарлықтай активтілік көрсеткенін айқындады.

**Түйінді сөздер:** антибактериалды активтілік, триклозан, хлоргексидин, хитозан, карбоксиметилцеллюлоза, мультиқабаттар.

**PHYSICAL AND CHEMICAL SUBSTANTIATION OF APPLICATION TRICLOSAN AND CHLORHEXIDINE FOR OBTAINING OF ANTIBACTERIAL COATING BASED ON CHITOSAN AND CARBOXYMETHYLCELLULOSE**

*PhD Savdenbekova B.Е.\*, d.c.s., prof. Ospanova А.К.\*,
d.c.s., prof. Оmarova R.А.\*\*, c.m.s, assistant prof. Yskakova М.К.\*\*,
d.m.s, prof. Zhartybaev R.N.\*\**

*Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan*

*S.D. Asfendiyarov Kazakh national medical university, Almaty, Kazakhstan*

Developed physical-chemical study of obtaining of multilayers based on chitosan and carboxymethylcellulose, substantiated application of triclosan and chlorhexidine as antibacterial agents for nanocoatings on silicic plates. Study of antibacterial activity of the obtaining multilayers on siliceous plates showed good activity against many bacteria.

**Key words:** antibacterial activity, triclosan, chlorhexidine, chitosan, carboxymethylcellulose, multilayers.