**УДК 544.016**

**Савденбекова Б.Е.\*, Оспанова А.К.\*, Абдуразаков У.А.\*\*, Искакова М.К.\*\*,
 Жартыбаев Р.Н.\*\*, Ашимхан Н.С.\*\*\*, Абдикара А.С.\***

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

 Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендирова
 г. Алматы, Казахстан

Казахский национальный исследовательский технический университет
им. К.И.Сатпаева, г. Алматы, Казахстан

\* balzhan.savdenbekova@gmail.com

**Исследование антибактериальной активности триклозана и хлоргексидина в мультислоях на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы**

Разработаны оптимальные условия получения мультислоев на основе хитозана и карбоксиметилцеллюлозы, обоснованы процессы взаимодействия выбранных полиэлектролитов с триклозаном, получены антибактериальные нанопокрытия на кремневых пластинках и исследованы их свойства. Исследование антибактериальной активности полученных мультислоев на кремневых пластинках показали хорошую активность по отношению ко многим бактериям.

**Ключевые слова:** антибактериальная активность, триклозан, хлоргексидин, хитозан, карбоксиметилцеллюлоза, мультислои.

**Савденбекова Б.Е.\*, Оспанова Ә.Қ.\*, Абдуразаков У.А.\*\*, Искакова М.К.\*\*,
 Жартыбаев Р.Н.\*\*, Әшімхан Н. С.\*\*\*, Әбдіқара А.С.\***

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

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

Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті
Алматы қ., Қазақстан

**Хитозан мен карбоксиметилцеллюлоза негізіндегі мультиқабаттардағы триклозан мен хлоргексидиннің антибактериалды активтілігін зерттеу**

Хитозан мен карбоксиметилцеллюлоза негізінде мультиқабаттарды алудың оптималды шарттары анықталған, таңдап алынған полиэлектролиттермен триклозанның әрекеттесу үдерісі түсіндірілген, кремнилі төсемшемелерде антибактериалды наножабындар алынған және олардың қасиеттері зерттелінген. Зерттеулер кремнилі төсемшемелерде алынған антибактериалды наножабындар көптеген бактериаларға қарсы жақсы активтілікке ие екенін көрсетті.

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

**Savdenbekova B.Е.\*, Ospanova А.К.\*, Abdurazakov U.А.\*\*, Yskakova M.K.\*\*,
 Jartybaev R.N.\*\*, Ashymkhan N.S.\*\*\*, Abdikara A.S.\***

Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan

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

Kazakh national research technical university after K.I.Satpeyev, Almaty, Kazakhstan

**The study of antibacterial activity of triclosan and chlorhexidine in multilayers based on chitosan and carboxymethylcellulose**

Developed optimal conditions of obtaining of multilayers based on chitosan and carboxymethylcellulose, substantiated process of the interactions of selected polyelectrolyte with triclosan, obtained antibacterial nanocoatings on silicic plates and studied their properties. 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.

**1. Введение**

В настоящее время в связи с интенсивным развитием прикладных аспектов нанотехнологии, в научной литературе обсуждается возможность применения полиэлектролитных покрытий для решения ключевых задач биомедицины [1-4]. Фиксация бактерий и развитие биопленки на поверхности имплантирующих биомедицинских устройств очень часто приводят к инфекциям и воспалениям, к сожалению, даже к необходимости их удаления. В связи с этим остро стоит вопрос ингибирования роста биопленки вокруг имплантата. После образования на поверхности имплантата биопленки обычно требуется удаление последней и применение антибиотиков. Превентивные стратегии предусматривают профилактическое применение антибиотиков до возможного формирования биопленки или использование «умных» поверхностей, которые предотвращают колонизацию или обладают противомикробными свойствами. Имплантаты, обработанные противомикробными средствами, предотвращающими бактериальную адгезию и формирование биопленки, могут позволить обойтись без долгосрочной неэффективной системной антибиотикотерапии, снизить риск развития резистентности и необходимости удаления имплантата. Ультратонкие мультислойные пленки, содержащие антибактериальные агенты, протеины и пептиды, которые могут быть наращены на поверхности объектов, вносимых в живой организм, могут послужить такими носителями.

Одним из наиболее перспективным в научном и прикладном отношении разновидностей антибактериальных покрытий, являются тонкие полимерные пленки [5-7], 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 хитозана и крабоксиметилцеллюлозы натрия, нанесенных на кремневые пластинки и содержащие в полислоях такие антибактериальные агенты, как триклозан и хлоргексидин.

**2. Эксперимент**

Методы проведения исследований - метод мультислойной сборки (LBL) [8-10].

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 (0,5 ЕД 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 карбоксиметилцеллюлозы натрия – 0,06 моль/л, хитозана 0,06 моль/л,
рН 8,5. Исходные концентрации водных растворов анитимикробных реагентов
10-3  моль/л.

**3. Результаты и 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. Результаты этих исследований приведены в таблице 1.

**Таблица 1** - Значение рН системы хитозaн-триклозaн при температуре 38 оС

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пробы | Cоотношение хитoзaн : триклoзaн (К) | pH |
| 1 | 1:9 | 12,74 (осадок) |
| 2 | 3:7 | 10,86 |
| 3 | 4:6 | 7,98 |
| 4 | 5:5 | 6,43 |
| 5 | 6:4 | 5,98 |
| 6 | 7:3 | 5,70 |
| 7 | 9:1 | 5,26 |

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. Так как при совместном присутствии обоих реагентов уменьшается рН, то предпочтение отдается атомам хлора и химизм их взаимодействия можно предположить следующим образом, рисунок 1:



**Рисунок 1** - Схема взаимодействия хитозана и триклозана

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

Изучение влияние рН, температуры и ионной силы раствора на двойную систему КМЦ-триклозан, таблица 2 показали, что каких либо фазовых изменений не наблюдается.

**Таблица 2** - Изучение влияния рН, температуры и ионной силы раствора на двухкомпонентную систему КМЦ + триклозан

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | Состав КМЦ:триклозан | pH, 25 0С,ионная сила0,01 | рН, 30 0С, ионная сила 0,05 | рН, 35 0С, ионная сила 0,01 | рН, 40 0С, ионная сила 0,01 |
| 1 | 1:9 | 12,85 | 12,81 | 12,80 | 12,89 |
| 2 | 3:7 | 12,75 | 12,76 | 12,75 | 12,67 |
| 3 | 4:6 | 12,71 | 12,74 | 12,70 | 12,61 |
| 4 | 5:5 | 12,61 | 12,65 | 12,63 | 12,56 |
| 5 | 6:4 | 12,57 | 12,69 | 12,63 | 12,51 |
| 6 | 7:3 | 12,32 | 12,56 | 12,51 | 12,50 |
| 7 | 9:1 | 12,32 | 12,44 | 12,45 | 12,46 |

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 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 2.

 

**Рисунок 2** - Зависимость оптической плотности смеси хитозан : КМЦ от рН раствора и их состава при температуре 38 0С

Как показали результаты исследований, между хитазаном 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 хитазан притягивает к себе протоны водорода (Н+). Схему появления зарядов на поверхности молекул этих соединений можно предположить следующим образом, рисунок 3.

**Рисунок 3** - Взаимодействие полиэлектролитов с буферными растворами

Таким образом, механизм получения бислоев в мультислоях между хитзоаном и карбоксиметицеллюлозой можно представить по следующей схеме, рисунок 4.

****

**Рисунок 4** - Схема получения мультслоев на основе хитозана и карбоксиметицеллюлозой натрия

Продолжением дальнейших исследований было изучение зависимости толщины и шероховатости покрытий от числа бислоев, рисунок 5-6. 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 5** - 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 6** - 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 мин. после инокулирования на подсохшую поверхность агара нанесли пластинки с антимикробными свойствами. Чашки в течение 30 мин. оставляли при комнатной температуре, а затем, не переворачивая, инкубировали в термостате при температуре 28-37 0С 24-48 ч. до 5 сут. Зоны угнетения микробного роста измеряли миллиметровой линейкой.

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 большей 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.

**4. 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 хитазана 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.

Исследования проведена в рамках проекта “Получения полиэлектролитных мультислоев с антибактериальными свойствами для медико-биологических и имплантируемых систем”

**Список литературы**

1 Галаев И.Ю. «Умные» полимеры в биотехнологии и медицине // Успехи химии. - 1995. - Т. 64, №5. - С. 505-524.

2 Pavlukhina S., Sukhishvili S. Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces // Adv. Drug Delivery Rev. – 2011. –Vol. 63. –P. 822-36.

3 O’Toolе,G.A.,O’Toolе G.A., Kaplan H.B., Kolter *R.* Biofilm formation as microbial development // Ann. Rev. Microbiol. —2000. ― Vol. 54. ― P. 49–79.

4 Elbert D.L., Herbert C.B., Hubbell J.A. Thin Polymer Layers Formed by Polyelectrolyte Multilayer Techniques on Biological Surfaces // Langmuir. – 1998. –Vol.15. –P. 5355–5362.

5 Тапальский Д.В., Осипов В.А., Сухая Г.Н., Ярмоленко М.А., Рогачев А.А., Рогачев А.В. Биосовместимые композиционные антибактериальные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – Т. 36, №2. – С. 129-134.

6 Голосова А. Тонкие полимерные пленки на основе мультислойной сборки // Наноиндустрия. -2007. -№4. -С. 34-36.

7 Оспанова А.К., Омарова Р.А., Искакова М.К., Жартыбаев Р.Н., Савденбекова Б.Е. Физико-химические основы получения нано пленок с антибактериальными свойствами // Вестник КазНМУ. – 2015. - №4. – С. 487-491.

8 Sukhishvili S.A., Responsive polymer films and capsules via layer-by-layer assembly // Current opinion in Colloid & Interface science -2005. –Vol.10. –P. 37-44.

9 Kharlampieva E., Sukhishvili S. Hydrogen bonded layer-by-layer polymer films // Macromolecular scince. – 2006. – Vol.46. – P.377-395.

10 Oспанова А.К., Омарова Р.А., Абдуразаков УА., Жартыбаев Р.Н., Искакова М.К., Савденбекова Б.Е., Aмхадова М.А. Метод мультислойной сборкой как альтернатива антибактериальным покрытиям медико-биологических имплантатов // Стоматология. – 2016. – Т. 95, №1. – С. 9-13.

11 Оспанова А.К., Омарова Р.А., Жартыбаев Р.Н., Искакова М.К., Савденбекова Б.Е., Ашимхан Н.С. Кванто-Химическое Исследование Хлоргексидина как антибактериального препарата // Приоритеты Мировой Науки: Эксперимент И Научная Дискуссия. - Северный Чарльстон (США), - 2016. - С 153-159.

12 MentbayevaА.А., Ospanova А.К., Tashmuham-betova Z.H., Sokolova V.V., Sukhishvili S. Polymer-metal complexes in polyelectrolyte multilayer films as catalysts for oxidation of toluene // Langmuir –2012. –Vol.28, –P. 11948–11955.

**References**

1 Galaev IU (1995) Progress of chemistry [Uspehi himii] 64:505-524. (In Russian)

2 Pavlukhina S, Sukhishvili S (2011) Adv. Drug Delivery Rev 63:822-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.017>.

3 O’Toolе, GA, O’Toolе GA, Kaplan HB, Kolter R (2000) Ann. Rev. Microbiol 54:49–79. DOI:[10.1146/annurev.micro.54.1.49](https://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49).

4 Elbert DL, Herbert CB, Hubbell JA (1998) Langmuir 15:5355–5362. DOI**:**10.1021/la9815749.

5 Tapalski DV, Osipov V.A, Suhaya GN, Yarmolenka MA, Rogachev AA, Rogachev AV (2013) Problems of health and ecology [Problemy zdorovya i ekologii] 36:129-134. (In Russian).

6 Golosova А (2007) Nanoindustry [Nanoindustrya]. 4:34-36. (In Russian).

7 Ospanova АК, Оmarova RА, Iskakova МК, Jartybaev RN, Savdenbekova BE (2015) Medicine Bulletin of Kazakh National Medical University [Vestnik KazNMU] 4:487-491.
(In Russian).

8 Sukhishvili SA (2005) Current opinion in Colloid & Interface science 10:37-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.001>.

9 Kharlampieva E, Sukhishvili S (2006) Macromolecular scince 46:377-395. http://dx.doi.org/10.1080/15583720600945386.

10 Ospanova AK, Omarova RA, Abdurazakov UA, Jartybaev RN, Iskakova MK, Savdenbekova BE, Amkhadova MA (2016) Stomatology [Stomotologya] Т. 95:9-13.
 (In Russian).

11 Ospanova АК, Оmarova RA, Jartybaev RN, Iskakova MK, Savdenbekova BE, Ashimhan NS (2016). Proceeding of X International Conference on The Prorities of the world science: Experiments and scientific debate, North Charleston, USA. P.153-159.

12 MentbayevaАА, Ospanova АК, Tashmuhambetova ZH, Sokolova VV, Sukhishvili S (2012) Langmuir 28:11948–11955. **DOI:** 10.1021/la3025342.