

УДК 615.28

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И ЭТОНИЯ

Блажеевский Н.Е., Бойко Н.Н.

Национальный фармацевтический университет,
г. Харьков, Украина

Предложен состав и изучена противомикробная активность двух комбинированных композиций на основе пероксида водорода и этония. На основании установленной взаимосвязи между концентрацией компонентов и интегральным показателем противомикробной активности композиций с использованием метода векторной алгебры осуществлена оценка противомикробной активности исследуемых композиций. Показано, что бактерицидные свойства их остаются на высоком уровне вплоть до разведения их до 1:4, при экспозиции 10 мин.

Ключевые слова: дезинфекция, пероксид водорода, этоний, противомикробная активность.

В настоящее время в медицине и ветеринарии разработаны и внедрены в практику меры по предупреждению заражения людей и животных при их плановом оперировании или случайном повреждении – асептика, дезинфекция, стерилизация. Для этих целей могут использоваться разные физические (УФ, пар, фильтрация, жар, радиоактивное излучение и пр.) и химические методы (различные группы веществ, проявляющие противомикробные, спороцидные, противовирусные, противогрибковые свойства и пр.).

Одним из удобных в использовании, дешевых и экспрессных методов дезинфекции остается химический метод. Среди многообразия веществ, применяемых для уничтожения микроорганизмов для медицинских и ветеринарных целей, особое внимание привлекают пероксидные соединения, благодаря их экологической безопасности, а также четвертично аммониевые соединения (ЧАС), обладающие дополнительно еще и поверхностно-активными свойствами [1].

Одним из представителей противомикробных средств, принадлежащих к ЧАС, является препарат «Этоний». Бактериостатическое, а в более высоких дозах бактерицидное действие, он проявляет в основном на грамположительные кокки. Обладает дополнительно местным анестезирующим действием. В восприимчивых популяциях бактерий встречаются устойчивые к препарату варианты. Применяют в виде 0,5-1% растворов, 0,5-2% мази для лечения трофических язв, трещин, дерматитов, особенно сопровождающихся зудом, стоматитов, гингивитов; в виде 0,1% глазных капель для лечения язв роговицы, кератитов, гнойных отитов; в виде 0,1-0,5 %

растворов для терапии тонзиллитов, стоматитов, вызванных стафилококками и стрептококками.

Самым простым соединением класса перекисей является пероксид водорода (ПВ). Он обладает почти универсальным противомикробным действием. К нему чувствительны грамположительные и грамотрицательные бактерии, вирусы, многие виды патогенных грибов.

Вместе с тем препарат относительно быстро разлагается на свету, при взаимодействии с переходными металлами, органическими веществами. Так, в органических субстратах, содержащих тканевые и микробные пероксидазу и каталазу, противомикробная активность ПВ быстро снижается. Кроме того, в последнее время отмечено снижение чувствительности микробов к ПВ и появление устойчивых к этому препарату вариантов бактерий. Это обусловлено селекцией активных продуцентов каталазы [1].

Дальнейшие научные исследования в области химии ПВ, повышения стабильности, создания комбинированных средств дают надежду на устранение недостатков этого ценного и превосходного по многим параметрам препарата, который применяют для дезинфекции различных объектов, предстерилизационной очистки инструментов, а также как антисептик для профилактической и терапевтической антисептики [2].

Цель работы – разработать состав и проверить на противомикробную активность комплексные препараты на основе пероксида водорода и этония для использования в качестве антисептика и/или дезинфектанта в медицине и/или ветеринарии.

Материалы и методы

Комплексные противомикробные композиции создавали на основе двух групп антисептиков: пероксида водорода и этония (квалификации хч.). Состав первой композиции (*композиция 1*), % масс.: пероксид водорода – 16,7 %; этоний – 12,0 %; пиродифосфат натрия – 0,06 %; вода и стабилизаторы до 100 %. Состав второй композиции (*композиция 2*), % масс.: пероксид водорода – 18,0 %; этоний – 12,0 %; этанол – 12,5 %; вода и стабилизаторы до 100 %.

Испытание противомикробной активности антисептических препаратов проводили на стандартных тест-штаммах следующих видов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* ATCC 11229; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Proteus vulgaris* H 4636; *Proteus mirabilis* ATCC 14153; *Enterococcus faecium* ATCC 6057; *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Candida albicans* ATCC 10231. Микробиологические исследования проводили на базе ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины» по известным методикам [1, 3].

Противомикробную активность композиций изучали с помощью диффузионного метода

«колодцами»; микробная нагрузка составляла $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл среды (КОЕ – колониеобразующая единица).

При оценке противомикробной активности изучаемых композиций методом диффузии (колодцами), применяли следующие критерии: отсутствие зон задержки роста микроорганизмов вокруг лунки, а также зоны задержки до 10 мм указывает на то, что микроорганизм не чувствителен к внесенному в лунку препарату или к раствору противомикробного вещества определенной концентрации; зоны задержки роста диаметром 10-15 мм указывают на малую чувствительность культуры к противомикробному веществу в испытываемой концентрации; зоны задержки роста диаметром 15-25 мм расцениваются, как показатель чувствительности микроорганизма к испытываемому противомикробному веществу в определенной концентрации; зоны задержки роста, диаметр которых превышает 25 мм, свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизмов к противомикробному веществу в растворе данной концентрации.

Испытания препаратов проводили при следующих разведениях: цельный раствор, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Опыты повторяли трижды. Статистическую обработку результатов проводили согласно ГФУ [4].

Во второй серии экспериментов испытывали препараты на бактерицидную активность при разведении 1:4, связанной с экспозицией 1-3-5-10-30-60 минут. Микробная нагрузка $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. По истечении определенной экспозиции тест-штаммы микроорганизмов высевали на соответствующую среду в чашки Петри. Посевы бактерий помещали на 48 часов в термостат при 37 °С, а посевы грибов инкубировали при 22 °С в течение 72 часов.

Результаты оценивали качественно по наличию («+») или отсутствию колоний («-») на поверхности питательных сред.

Интегральную противомикробную активность комплексных препаратов (А) и (r^2) оценивали с помощью метода векторной алгебры. Этот метод ранее был применен одним из авторов для оценки противомикробной активности некоторых катион-активных антисептиков, а также настоек и высокоочищенных галеновых препаратов, а также для фармакоэкономической оценки противомикробных препаратов применяемых в стоматологии. Подробное описание расчетов данных показателей приведено в работах [5, 6]. В целом интегральный показатель противомикробной активности представляется как вектор в n-мерном пространстве с координатами в виде зоны задержки роста (мм) по каждому тест-штамму микроорганизма. Для препаратов со средней силой противомикробной активности значения интегрального показателя противомикробной активности находятся в диапазоне $A=1.5 \div 2.5$, а для препаратов с высокой противомикробной активностью его значения выше $A > 2.5$.

Вычисления констант в математических моделях проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Origin 8.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные изучения противомикробной активности композиции 1 по отношению к музейным штаммам микроорганизмов. Ниже приведены также рассчитанные значения величин интегрального показателя противомикробной активности (А) и квадрат коэффициента корреляции (r^2) для каждого вида разведения.

Таблица 1 – Противомикробная активность композиции 1

Тест-штамм	Диаметр зоны задержки роста (мм) разведений препарата: M±m				
	Исходный	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> 25923	40.2±3.9	33.8±4.1	27.8±3.2	25.6±3.4	21.4±2.9
<i>S. aureus</i> 6538	38.3±4.2	32.0±2.8	26.6±3.3	24.3±3.7	21.6±1.8
<i>E. coli</i> 25922	31.8±2.4	25.4±2.2	22.6±3.1	20.6±1.7	16.4±2.1
<i>E. coli</i> 11229	29.6±3.1	25.3±3.4	21.3±2.8	19.4±2.9	15.6±2.2
<i>P. aeruginosa</i> 27953	18.0±2.7	16.2±2.4	13.8±1.9	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 15442	17.6±2.2	16.4±2.7	14.5±1.6	0	0
<i>P. vulgaris</i> 4636	26.6±4.1	21.4±2.9	16.6±2.2	10.2±1.8	0
<i>P. mirabilis</i> 14153	24.8±3.3	21.6±3.1	16.2±2.8	12.5±2.4	0
<i>B. cereus</i> 10702	26.2±3.9	21.8±3.3	19.8±2.6	18.6±2.2	17.8±3.1
<i>E. faecium</i> 6053	32.4±1.9	29.2±2.7	24.7±2.7	19.0±2.1	16.3±1.8
<i>C. albicans</i> 10231	20.6±1.8	18.2±2.5	14.4±2.2	0	0
Интегральный показатель противомикробной активности (А) для соответствующих разведений					
A	3.81	3.24	2.71	2.20	1.80
Квадрат коэффициента корреляции					
r^2 *	0.937	0.945	0.943	0.681	0.536

* коэффициент корреляции находили по отношению к «виртуальному» препарату с показаниями диаметра зоны задержки роста по всем тест-штаммам 25 мм.

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, противомикробная активность композиции 1 сохраняется вплоть до разведения 1:16, но, начиная с

разведения 1:8, противомикробная активность композиции не проявлялась по отношению к тест-штаммам *P. aeruginosa* и *C. albicans*, а в разведении

1:16 композиция не проявляла активности и против *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

При этом интегральный показатель противомикробной активности закономерно снижается с разведением композиции и находится в диапазоне высокой активности для разведений вплоть до 1:4, а при большем разведении переходит в диапазон средней активности вплоть до разведения 1:16.

В табл. 2 представлены данные противомикробной активности композиции 2 в отношении музейных штаммов микроорганизмов, а также приведены значения величин интегрального показателя противомикробной активности (A) и квадрат коэффициента корреляции (r^2) для каждого вида разведения.

Таблица 2 – Противомикробная активность композиции 2

Тест-штамм	Диаметр зоны задержки роста (мм) разведений препарата: M±m				
	Исходный	1:2	1:4	1:8	1:16
<i>S. aureus</i> 25923	30.8±2.9	25.4±3.2	21.8±3.1	18.6±2.4	17.2±2.4
<i>S. aureus</i> 6538	31.9±3.1	27.2±1.9	23.6±3.1	19.1±2.6	17.0±2.4
<i>E. coli</i> 25922	25.2±2.4	20.8±2.9	19.6±1.4	18.0±1.7	15.6±2.1
<i>E. coli</i> 11229	28.4±4.4	25.9±3.8	21.6±1.8	19.4±2.6	17.3±2.2
<i>P. aeruginosa</i> 27953	20.2±3.6	16.4±2.1	12.6±2.2	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 15442	21.3±2.7	17.9±3.1	14.2±2.6	0	0
<i>P. vulgaris</i> 4636	22.8±3.3	19.0±3.1	15.6±2.4	12.6±2.1	0
<i>P. mirabilis</i> 14153	24.0±1.6	21.6±2.4	16.4±2.1	14.2±1.9	0
<i>B. cereus</i>	21.8±2.6	19.6±2.1	18.2±2.8	16.4±1.9	14.7±1.9
<i>E. faecium</i> 6053	27.7±3.2	23.4±3.4	20.1±2.8	17.5±1.7	12.4±1.5
<i>C. albicans</i> 10231	21.1±2.0	18.9±2.1	13.2±1.2	0	0
Интегральный показатель противомикробной активности (A) для соответствующих разведений					
A	3.36	2.88	2.42	1.94	1.55
Квадрат коэффициента корреляции					
r^2 *	0.976	0.976	0.962	0.714	0.539

* коэффициент корреляции находили по отношению к «виртуальному» препарату с показаниями диаметра зоны задержки роста по всем тест-штаммам 25 мм.

Как видно из результатов, представленных в табл. 2, противомикробная активность композиции 2 аналогична композиции 1, однако несколько уступает по интегральному показателю противомикробной активности в среднем на 13.5 %, но незначительно превышает по квадрату коэффициента корреляции. Возможно, это связано с наличием этанола в данной композиции, данный результат является основанием для дальнейших исследований в выяснении возможного механизма снижения противомикробной активности препарата.

В связи с использованием широкого диапазона концентраций противомикробных

компонентов в исследованиях, нам удалось найти интересную закономерную связь между интегральным показателем противомикробной активности и концентрацией противомикробных компонентов: величина A линейно возросла с увеличением логарифма концентрации противомикробных компонентов в растворе ($\ln C$). Ниже на рис. 1, отображена зависимость интегрального показателя противомикробной активности (A) от натурального логарифма концентрации суммы противомикробных компонентов ($\ln C$) для композиции 1.

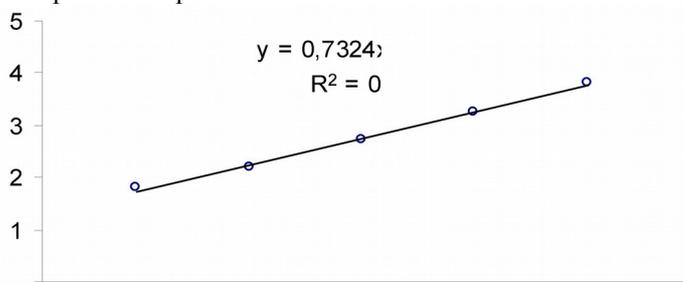


Рис. 1 Зависимость интегрального показателя противомикробной активности от натурального логарифма концентрации суммы компонентов для композиции 1

Как видно из рис. 1, величина интегрального показателя противомикробной активности является линейной функцией натурального логарифма концентрации по сумме компонентов для композиции 1. Причем, коэффициент детерминации для этой зависимости имеет очень высокое значение ($R^2=0.9961$), что может говорить об адекватности

принятых теоретических предпосылок для описания противомикробных свойств.

На рис. 2 отображена зависимость интегрального показателя противомикробной активности (A) от натурального логарифма концентрации суммы противомикробных компонентов (lnC) для композиции 2.

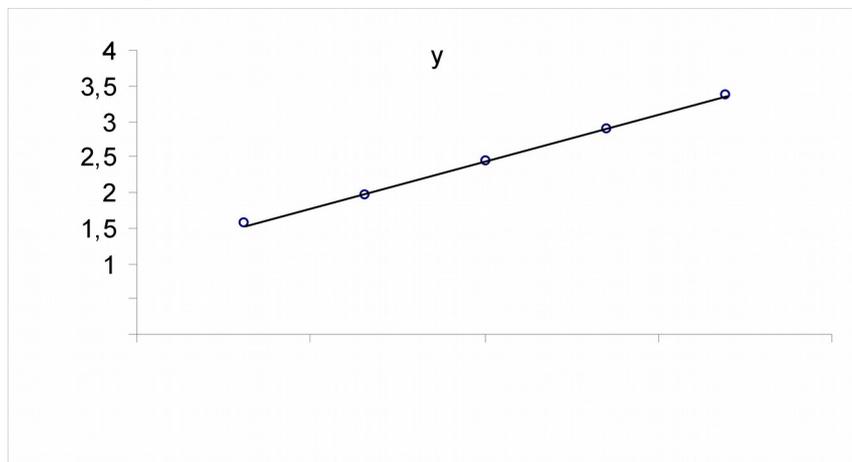


Рис. 2 Зависимость интегрального показателя противомикробной активности от натурального логарифма концентрации суммы компонентов для композиции 2

Как видно из рис. 2, зависимость интегрального показателя противомикробной активности от натурального логарифма концентрации по сумме компонентов для композиции 2 также линейна. Причем, коэффициент детерминации имеет высокое значение ($R^2=0.9988$).

Таким образом, выявленная закономерность позволяет прогнозировать интегральный показатель противомикробной активности в зависимости от концентрации вещества в препарате на всем диапазоне изменения концентраций всего по двум парам координат ($A_1; C_1$) и ($A_2; C_2$).

Далее, нами была предпринята попытка описать зависимость квадрата коэффициента корреляции, который характеризует спектр противомикробной активности, от концентрации суммы противомикробных компонентов в композициях. Из математических закономерностей, которые могут наилучшим образом, интерпретированы в наших микробиологических исследованиях, подходит логистический закон (один из ряда сигма функций):

$$r^2 = \frac{M}{1 + \exp[-k \cdot (C - C_s)]}$$

где r – коэффициент корреляции (его квадрат выражает спектр противомикробной активности препарата);

M – константа (теоретический предел, к которому стремится зависимость);

k – константа (характеризует кинетику процесса), % масс.⁻¹;

C – концентрация суммы компонентов, % масс.;

C_s – константа (концентрация препарата, воздействующая на 50 % тест-штаммов микроорганизмов), % масс.

Для композиции 1 константы логистического закона равны: $M=0.99$, $k=0.52$, $C_s=1.51$ при этом коэффициент детерминации для зависимости равен $R^2=0.9829$. Для композиции 2 константы логистического закона равны: $M=0.99$, $k=0.50$, $C_s=1.58$ при этом коэффициент детерминации для зависимости равен $R^2=0.9830$. Подобная зависимость позволяет в дальнейшем прогнозировать спектр противомикробной активности препаратов в зависимости от концентрации активных компонентов (в рамках исследуемых тест-штаммов).

Следующий этап изучения антисептических композиций 1 и 2 заключался в определении их микробоцидной активности. Результаты бактерицидной активности композиций приведены в табл. 3.

Таблица 3. Бактерицидная активность композиций 1 и 2 (разведение 1:4), связанная с экспозицией

Препарат	Тест-штаммы	Время контакта суспензии микроорганизмов с препаратом в течение (мин)*					
		1	3	5	10	30	60
Композиция 1 / 2	<i>S. aureus</i> 25923	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>S. aureus</i> 6538	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>E. coli</i> 25922	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

	<i>E.coli</i> 11229	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>P. aeruginosa</i> 27953	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>P. aeruginosa</i> 15442	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>P. vulgaris</i> 4636	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
	<i>P. mirabilis</i> 14153	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
	<i>B. cereus</i> 10702	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>E. faecium</i> 6053	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>C. albicans</i> 10231	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-

* Примечание. Знак «-» указывает на отсутствие роста микроорганизмов, знак «+» указывает на рост микроорганизмов, знак «/» означает, что в числителе приведен результат для композиции 1, а в знаменателе для композиции 2.

Согласно данным табл. 3 уровни бактерицидной активности композиций 1 и 2 в разведении 1:4 полностью совпадают и находятся в зависимости от вида бактерий.

Изученные композиции наиболее активны в отношении штаммов «грамположительных кокков» группы (стафилококки, энтерококки), для которых бактерицидная экспозиция составляет одну минуту.

E. coli и *P. aeruginosa*, а также *B. cereus* оказались более устойчивыми к действию препаратов (бактерицидная экспозиция – 3 минуты).

Для торможения роста бактерий рода *Proteus* и грибов рода *Candida* требуется увеличить время контакта композиций с микроорганизмами более 5 минут.

Выводы

Разработан состав и проверены на противомикробную активность комплексные препараты на основе пероксида водорода и этония. Показано, что композиция 1 на 13,5 % активнее композиции 2.

Установлена линейная зависимость величины интегрального показателя противомикробной активности от логарифма концентрации компонентов противомикробных композиций. Для описания зависимости спектра активности от концентрации противомикробных препаратов предложена перспективная математическая модель – логистическая зависимость.

Противомикробные свойства исследуемых композиций остаются на высоком уровне вплоть до разведения их до 1:4 при экспозиции, равной 10 мин.

Полученные результаты противомикробной активности испытуемых композиций свидетельствуют о перспективности их дальнейшего изучения на предмет использования в качестве дезинфектантов в медицине и/или ветеринарии.

References

1. Krasil'nikov, A. P. Handbook of antiseptics [Text] / A. P. Krasil'nikov. - Minsk : Higher School, 1995. - 367 p.
2. Kanishchev, V. V. The sporocidal activity of desinfectants based on hydrogen peroxide [Text] / V. V. Kanishchev, V. V. Buyanov, N. V. Litusov, V. P. Nikolskaya, O. B. Pudova, I. P. Suprun, K. V. Titiva // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences, 2004. - №1. - P.23-30.

3. Instructions for determining the bactericidal properties of new disinfectants / USSR Ministry of Health, № 739-68. - M., 1968. - 15 p.

4. State Pharmacopoeia of Ukraine [Text] / State Enterprise "Scientific and Expert Pharmacopoeias Centre." – 1st Ed. – H.: RIREH, 2001. - Appendix 1. – 2004. – 520 p.

5. Boyko, N. N. Vector algebra theory in analysis of properties of antibacterial medications [Text] / N. N. Boyko, A. I. Zaytsev, T. P. Osolodchenko // Annals of Mechnikov Institute. – 2014. - №1. – P. 20-26.

6. Boyko, N. N. Pharmacoeconomic analysis of antibacterial medications used in dentistry [Text] / N. N. Boyko, A. I. Zaytsev, L. V. Nefedova, L. V. Yakovleva // Clinical pharmacy. – 2014. – Vol. 18, No. 1. – P.59-64.

UDC 615.28

THE STUDY ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMBINATION DRUGS ON THE BASIS OF HYDROGEN PEROXIDE AND AETHONIUM Blazheyevskiy, N.Ye., Boyko, N.N.

Formulation of two complex antimicrobial compositions on the basis of hydrogen peroxide and aethonium has been developed: hydrogen peroxide – 16.7 %; aethonium – 12.0 %; sodium pyrophosphate – 0.06 %; water and stabilizing agents up to 100 % (composition 1) and hydrogen peroxide – 18.0 %; aethonium – 12.0 %; ethanol – 12,5 %; water and stabilizing agent up to 100 % (composition 2); and their antimicrobial activity has been studied by agar diffusion method on standard microorganism test strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Escherichia coli* ATCC 11229; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Proteus vulgaris* H 4636; *Proteus mirabilis* ATCC 14153; *Enterococcus faecium* ATCC 6057; *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Candida albicans* ATCC 10231. We have carried out assessment of integrated antimicrobial activity of complex drugs using vector algebra. It has been demonstrated that there is a direct correlation between the integrated index of antimicrobial activity and logarithm of concentration of antimicrobial components in the solution. An advanced mathematical model for description of the dependence of activity spectrum on concentration of antimicrobial drugs has been suggested – logistic dependence. It has been determined that composition 1 is 13.5 % more active when compared to composition 2. In the result of the study of antiseptic compositions 1 and 2 in the following dilutions: undiluted, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, and determination of their

microbicidal activity associated with 1-3-5-10-30-60-minute exposition with microbial burden of clinical and test strains $2 \cdot 10^9$ CFU/mL using the method for assessment of antimicrobial activity of drugs developed, we have come to the conclusion that antimicrobial properties of the compositions studied maintain at the high level up to their dilution to 1:4; at this dilution, an optimal bactericidal exposition of 10 min has been determined. We have come to the conclusion as for potential of use of the combined antimicrobial compositions on the basis of hydrogen peroxide and quaternary ammonium compounds suggested as antiseptic agents and disinfectants in medicine and/or veterinary.

Key words: disinfection, hydrogen peroxide, aethonium, antimicrobial properties.