



УДК 577.472:541.183

Разработка твердофазных полимерных бактерицидов и оценка их свойств

Фомин П.А., Черкасова Т.А., Лейкин Ю.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, Москва

Поступила в редакцию 20.10.2011 г.

Аннотация

Для улучшения методики хранения ксеноаортальных биопротезов была проведена сорбция биоцидного вещества на твердофазный полимерный носитель. Произведена количественная оценка бактерицидности полученного полимера.

Ключевые слова: биоцидное вещество, сульфокатионообменник, карбоксильный катионообменник, бактерицидность

The sorption of biocide on the solid polymeric carrier has been investigated in order to modify the storage methods of xeno-bio-prosthesis. The quantitative evaluation of biocide properties has been made.

Keywords: biocide, sulfur cation resin, carboxyl cation resin, bactericide effect

Введение

Современная трансплантология испытывает недостаток веществ, способных обеспечить бактериостатичность имплантатов, не изменяя из физико-химических свойств. Основным требованием, предъявляемым к методам стерилизации имплантатов, в частности ксеноаортальных биопротезов, является сохранение структурной стабильности и функциональных характеристик их тканей [1]. Исследования показали, что применение таких методов, как обработка оксидом этилена, формалином и гамма-облучением с применением быстрой заморозки, неэффективны ввиду их повреждающего ткани воздействия [2]. В настоящее время для стерилизации используют водорастворимые средства. Для этих целей применяются смеси водных растворов антибиотиков или растворы альдегидов, показавшие высокую биоцидную активность в отношении грибов, вирусов и бактерий [1,2]. Однако, свободные остатки этих веществ на биопротезе могут приводить к его отторжению тканью реципиента, поэтому для снижения токсического воздействия проводят тщательную отмывку протеза физиологическим раствором, что, впрочем, не обеспечивает отсутствия токсичности, а длительность процесса затрудняет выбор оптимального размера протеза [1]

Теоретическая часть

Исследовательские работы велись в двух основных направлениях:

1. Разработка полимерного соединения, обладающего бактерицидными и вирулицидными свойствами и способностью к дезинфекции по ряду возбудителей гнойных инфекций, кишечной палочки и особенно антибиотико-устойчивых форм, методом сорбции биоцидного вещества на твердофазный полимерный носитель.

2. Разработка методики оценки сорбции и апробация биоцидной активности полученного соединения.

В качестве биоцидного вещества был выбран теотропин - экологически безопасный дезинфектант нового поколения, обладающий инактивирующим действием в отношении бактерий, вирусов, грибов, микоплазм. Применяемый дезинфектант относится к группе азаадамантанов - малотоксичный препарат (4 класс опасности по ГОСТ 12.007-76), который не обладает мутагенными, тератогенными, кумулятивными, иммунодепрессивными и кожно-резорбтивными свойствами. Механизм действия основан на разрушении нуклеиновых кислот микроорганизмов. Теотропин относится к химическому классу каркасных гетероциклических соединений - молекула теотропина состоит из четырех третичных атомов азота, алкилированных метильными группами, причем в исходном препарате отмечено содержание полимерных фрагментов.

В качестве полимеров использовали два катионообменника фирмы Purolite:

1. Сульфокатионообменник марки PFC 100 E гелевой структуры, который представляет собой стиролдивинилбензолный сульфированный сополимер в виде сферических гранул, обладающий высокой обменной емкостью (не менее 4,5 мэкв/г).

2. Карбоксильный катионообменник марки C 105 E гелевой структуры в H⁺-форме.

Преимущество биоцидного препарата, тем или иным способом включенного в твердую фазу полимера, состоит в том, что он не выделяет в очищаемую среду дополнительных веществ, тем самым предотвращая необходимость отмывания трансплантата перед пересадкой. Отсутствие непосредственного контакта биоцидного вещества с трансплантатом позволяет избежать развития дистрофической кальцификации [1] и отторжения трансплантата вследствие его затрудненного приживания к ткани реципиента, что часто наблюдается при использовании водорастворимых дезинфицирующих средств.

Эксперимент

1. Методика зарядки катионообменника бактерицидом в статическом режиме.

Навеску катионообменника массой порядка 1г помещают в коническую колбу и заливают 50 мл водного раствора теотропина известной концентрации (5,67 и 8,54 мг/мл для сульфокатионообменника и 10 мг/мл для карбоксильного катионообменника). Контакт фаз осуществляют в течение определенного промежутка времени, после чего фазы разъединяют фильтрованием на стеклянном фильтре. Затем твердую фазу промывают три раза дистиллированной водой и один раз ацетоном. Объем одной промывки -10 мл. После этого твердую фазу количественно переносят с фильтра в прокаленный до постоянного веса бюкс и определяют привес по методике, изложенной в п. 2. Жидкую фазу анализируют потенциометрическим титрованием.

2. Методика определения привеса бактерицида на катионообменнике

Навеску воздушно-сухого сорбента взвешивают на электронных аналитических весах OHAUS Adventurer (Switzerland). После зарядки бактерицидом катионообменник в колонке промывают 3 об. воды и 2 об. ацетона. Катионообменник сушат до воздушно-сухого состояния в термощкафу марки SPT 200 (Horyzont, Венгрия) и взвешивают на аналитических весах. Определяют влажность исходного катионообменника и катионообменника после сорбции бактерицида.

Обсуждение результатов

Из интегральной кривой титрования водного раствора теотропина следует, что исходный pH раствора составляет 9,85. Данный факт характеризует теотропин как слабое основание. Ранее нами была проведена работа по определению константы ионизации теотропина с целью определения его концентрации в растворе и выявления механизмов сорбции. В результате проведенных исследований было установлено, что среднее значение pK_a составляет 7,03 при стандартном отклонении - 0,08 и относительном стандартном отклонении - 1,17%, а в реакции принимают участие только два атома азота из четырех (исходя из двух точек перегиба на интегральной кривой титрования) [3].

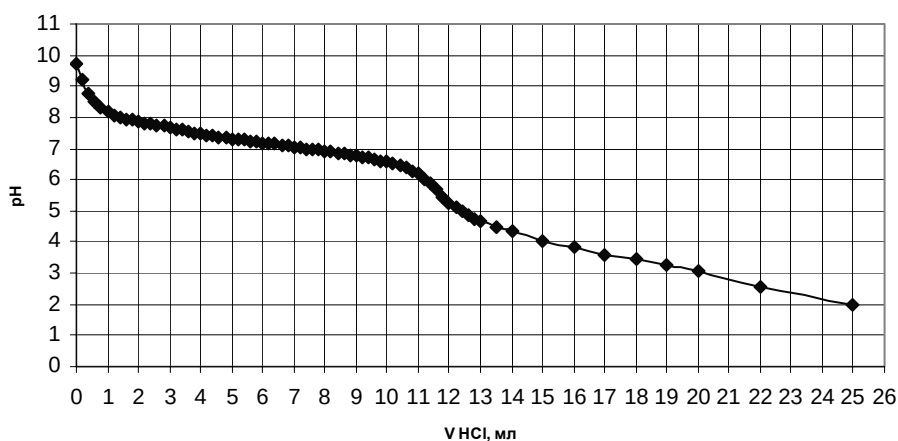


Рис. 1 Интегральная кривая титрования водного раствора теотропина 0,1 М HCl

В общем виде схему реакции сульфокатионообменника с теотропином можно представить как взаимодействие 2-х третичных атомов азота молекулы теотропина с протонами сульфогрупп сорбента с образованием ионной связи (рис. 2)

Известно, что емкость катионообменника зависит в первую очередь от количества диссоциированных ионогенных групп. Поэтому для того, чтобы получить полимер с достаточно высокой долей бактерицидной добавки, необходимо было обеспечить максимальную зарядку этого катионообменника.

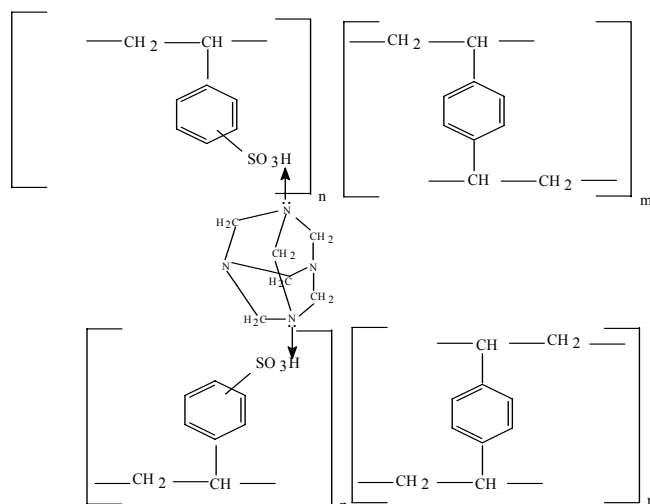


Рис.2 Конечный продукт связывания теотропина на сульфокатионообменнике PFC 100 E

При этом эффект бактерицидности будет в значительной степени зависеть от ряда инфекций и от pH окружающей среды. Создавая определенный pH внутри катионообменника, можно обеспечить эффект бактерицидности. Известно, что даже для обычных бактерицидов типа гипохлорида натрия или активного хлора, эффект бактерицидного действия чрезвычайно зависит от pH среды, в которой происходит это бактерицидное действие. Тем более, это необходимо для полимерных структур, которые могут показать различные бактерицидные эффекты для различных микроорганизмов. Причем есть грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Кроме того, известно, что для неселективных (универсальных) катионообменников, каким является сульфокатионообменник, его сорбционная способность описывается показателем кислотно-основного равновесия.

Наряду с параметром емкости был определен привес теотропина на сополимере гравиметрическим методом, и проведен эксперимент для разного времени контакта сульфокатионообменника с теотропином от 30 минут до 4-х часов при концентрации теотропина 8,54 мг/мл и 5,67 мг/мл, а также при предварительном набухании сорбента в воде и без него при комнатной температуре порядка $16 \div 18^\circ\text{C}$ и соотношении жидкой и твердой фаз $V:g=100$. Процесс сорбции контролировали по жидкой фазе методом потенциометрического титрования на pH-метре «Эксперт 001», а по твердой - гравиметрическим определением количества сорбированного бактерицида. Средний размер гранул исследуемой партии катионообменника - 0,027 см.

На рис.3 приведены кинетические зависимости количества связанного теотропина на грамм полимера от времени контакта сорбента с растворами теотропина. Как видно, теотропин лучше сорбируется из раствора с меньшей концентрацией (5,67 мг/мл). Это можно объяснить несколькими причинами: в более концентрированных растворах у небольшой, но достаточно объемной молекулы теотропина возникают пространственные затруднения.

Кроме того, как следует из величины рассчитанного эквивалента (табл. 1,2), для менее концентрированного раствора теотропина в реакции сорбции участвуют четыре атома азота, вместо двух, как в случае более концентрированного. Можно предположить образование поперечных сшивок при реакции с четырьмя азотами, что делает сорбированный бактерицид более прочным и препятствует вымыванию теотропина.

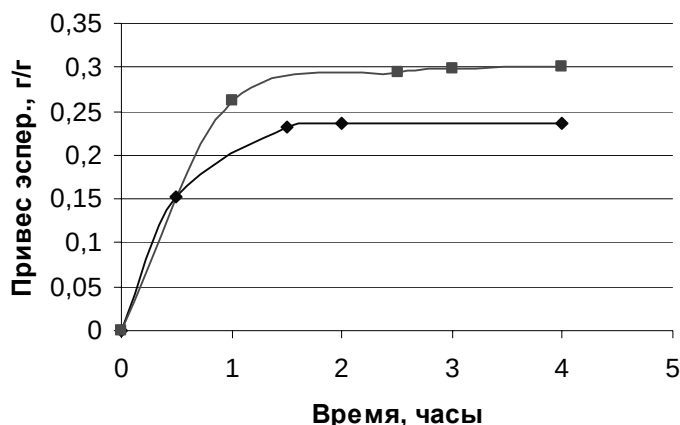


Рис. 3. Кинетическая зависимость экспериментального привеса теотропина на полимере в зависимости от времени контакта фаз
 □- при концентрации 5,67 мг/мл, ◇ -при концентрации 8,54 мг/мл

Таблица 1. Экспериментальные и расчетные данные для раствора теотропина с концентрацией 8,54 мг/мл

t, час	m, г	Объем титранта в точке перегиба кривой титрования раствора теотропина.,мл		COE по HCl, мэкв/г	Концентрация рабочего раствора HCl, мэкв/мл	Привес эспер., г/г	Расчет эквивалента	F по емкости
		Исходный раствор	Рабочий раствор					
0.5	0.543	12.2	9.4	2.58	0.094	0.153	59.36	0.629
1.5	0.533	12.2	8.2	3.75	0.082	0.233	61.99	0.916
2	0.553	12.2	8	3.80	0.080	0.235	62.00	0.926
4	0.528	12.2	7.9	4.07	0.079	0.235	57.85	0.993

Таблица 2. Экспериментальные и расчетные данные для раствора теотропина с концентрацией 5,67 мг/мл

t, час	m, г	Объем титранта в точке перегиба кривой титрования раствора теотропина.,мл		COE по HCl, мэкв/г	Концентрация рабочего раствора HCl, мэкв/мл	Привес эспер., г/г	Расчет эквивалента	F по емкости
		Исходный раствор	Рабочий раствор					
1	0.500	16.2	10.8	5.40	0.108	0.262	48.50	0.684
2.5	0.493	16.2	8.8	7.51	0.088	0.295	39.25	0.951
3	0.488	16.2	8.6	7.79	0.086	0.298	38.24	0.986
4	0.496	16.2	8.4	7.87	0.084	0.301	38.30	0.996

В табл. приведены экспериментальные значения емкости от времени для исследованных концентраций. Данные гравиметрического анализа сорбции совпадают с данными, рассчитанными по результатам потенциометрического титрования: теотропин также лучше сорбируется из раствора с меньшей концентрацией (5,67 мг/мл).

Таблица 3. Зависимость емкости сорбента от времени его контакта с раствором теотропина различной концентрации

Сисх. теотр.=5,67 мг/мл					С исх. теотр.=8,54 мг/мл				
Время контакта, ч	1	2	3	4	Время контакта, ч	1	2	3	4
СОЕ, мэкв/г	5.40	7.51	7.79	7.87	СОЕ, мэкв/г	2.58	3.75	3.80	4.07

В качестве второго полимерного носителя для ионного связывания теотропина был выбран гелевый карбоксильный катионообменник в H^+ -форме марки С105Е фирмы PUROLITE. Схема взаимодействия представлена на рис. 4:

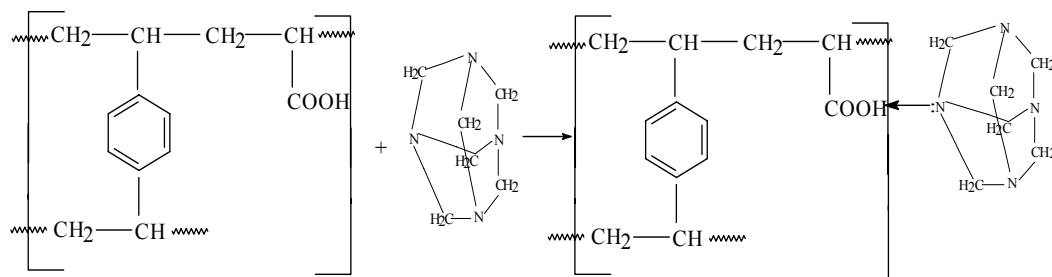


Рис. 4. Схема ионного связывания теотропина с карбоксильным катионообменником

Связывание теотропина на карбоксильном катионообменнике осуществляется за счет образования ионной пары между неподеленной электронной парой азота и водородом карбоксильной группы.

Для выявления оптимального режима связывания была исследована зависимость изменения степени зарядки от продолжительности контакта фаз при исходной концентрации бактерицида в растворе 10 мг/мл. Через определенное время фазы разъединяли и анализировали: жидкую - методом потенциометрического титрования, твердую - по привесу, с учетом процента влажности в полимере. По данным потенциометрического титрования определяли значения статической обменной емкости для каждого времени контакта.

Рассчитанные величины статической обменной емкости карбоксильного катионообменника показывают, что достаточный уровень сорбции обеспечивается за 2 часа, поскольку кривая зависимости емкости от времени выходит на плато (рис. 5). Поэтому дальнейшее увеличение времени контакта фаз представляется нецелесообразным. Данные анализа твердой фазы показали, что количество сорбированного теотропина составляет порядка 430 мг/г сорбента.

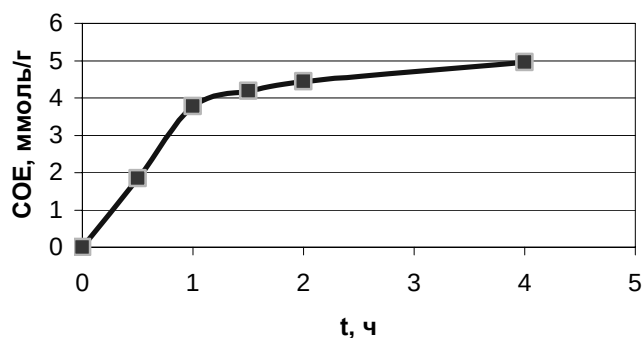


Рис. 5. Кривая зависимости статической обменной емкости от времени контакта фаз

Применение карбоксильного катионообменника для связывания теотропина является целесообразным, поскольку не изменяется рН биологических жидкостей организма. Это особенно важно при лечении болезней, вызванных повышенной кислотностью ЖКТ, когда использование сильнокислотных катионообменников физиологически недопустимо. Однако при связывании теотропина на карбоксильном катионообменнике образуется протонированная ионная пара – связь неподеленной пары электронов азота с водородом карбоксильной группы, которая может достаточно легко разрушаться при гидролизе. В результате разрушения ионной пары бактерицид вымывается в декантацируемую среду, что весьма ограничивает его применение, поскольку выведение бактерицида является очень важным при очистке крови, плазмы, других биологических жидкостей организма.

Оценку бактерицидности проводили луночным методом на тесте с культурой *E.coli* в сравнении с контролем. В качестве контроля использовался исходный теотропин, в количествах, соответствующих сорбированному. Эффективность оценивалась в процентах, как отношение диаметров зоны просветления газона для лунки с сорбентом и контрольной лунки с соответствующим количеством бактерицида. В результате проведенных исследований показано, что введенное количество теотропина в катионообменник обеспечивает обеззараживание на 73-74% против контроля. Оценка биоцидных свойств по аналогичному тесту сульфокатионообменника, заряженного теотропином, в институте ВНИИВВиМ (г. Покров) подтвердила эффективность применения такого сорбента для обеззараживания среды не только зараженной *E.coli*, но и сибирской язвой. Бактерицидный сорбент на основе теотропина даже при малых степенях зарядки показал бактерицидность к вегетативным и споровым формам сибирской язвы, птичьему гриппу, антраксу, ящуру.

Заключение

Поврежденные в процессе хранения биопротезы больше подвержены воздействию инфекций [4], которые могут привести к возникновению эндокардита, являющегося одним из самых сложных и запутанных заболеваний. Летальность при инфекционном эндокардите составляет от 14 до 45%, а в случаях грибкового эндокардита достигает 90% [5].

В результате проведенной оценки бактерицидных свойств выявлено, что катионообменник, заряженный теотропином, может быть рекомендован для обеззараживания биопротезов, контаминированных любыми формами микроорганизмов (включая споровые формы, в том числе сибирской язвы, и микоплазмы), а также возбудителями инфекции невыясненной этиологии.

Список литературы

1. Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленков В.И. Искусственные клапаны сердца // Олма Медиа Групп, 2007, 464 с.
2. Jian-Fei Hu, Linda Gilmer, R. Hopkins, Lloyd Wolfenbarger Jr. – Effects of antibiotics on cellular viability in porcine heart valve tissue – Cardiovascular research, 1989, 23, С. 960-964.
3. Альберт А., Сергент С. Константы ионизации кислот и оснований./под ред профессора Б.А. Парай-Кошица. М.-Л.: "Химия" 1964. -179 с.

4. Alain Prat, Andre Vincentelli, Henri Porte, Alain Wurth - Combined tracheal resection and aortic valve replacement with a cryopreserved aortic valve allograft - European Journal of Cardio-thoracic Surgery 13 (1998), С. 606–608.

5. Молчанов А.Н. – Сохранение и протезирование хордмитрального клапана у больных инфекционным эндокардитом – Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Нижний Новгород – 2010.

Фомин Петр Александрович – аспирант кафедры «Проблем устойчивого развития» (ПУР) Российского химико-технологического университета им. Д. И. Менделеева, Москва

Лейкин Юрий Алексеевич – д.х.н., профессор кафедры «Проблем устойчивого развития» (ПУР) Российского химико – технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

Черкасова Татьяна Александровна – к.х.н., ведущий научный сотрудник Центра экотоксикометрии при ИПУР Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

Fomin Petr A. – postgraduate of the Problems Sustainable Development Department of D. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Leykin Yuriy A. – Doctor of Chemistry Science, professor of Department Institute of Chemistry and the Problems of Sustainable Development of D. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Cherkasova Tatjana A. – candidate of Chemistry Science, leading scientist of Centre ecotoxycometriy of Institute of Chemistry and Problems Sustainable Development of D. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow