

**СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ
КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ХЛОРГЕКСИДИНА – НОВОГО
ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НАНОДЕЗИНФЕКТАНТОВ**

**Галынкин В.А.¹ Еникеев А.Х.¹, Краснов К.А.², Гладчук А.С.², Герасимов В.Н.³,
Хрусталеv В.Н.⁴**

*1 – ООО «РОСБИО», 192019, Россия, г.Санкт-Петербург, ул. Мельничная д. 10 –А
7731254@mail.ru*

*2 – ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова
Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург,
ул. Бехтерева, д. 1, institute@toxicology.ru, krasnov_tox@mail.ru*

*3 – ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и
биотехнологии» Роспотребнадзора 142279, Московская обл., Серпуховский р-н., пос.
Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ, ilcvngerasimov@obolensk.org*

*4 – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
ул. Миклухо-Маклая, д. 6*

Резюме

Введение. Формирование устойчивости болезнетворных микроорганизмов к известным дезинфицирующим средствам (ДС) требует постоянного совершенствования арсенала ДС. Эффективность ДС может быть увеличена путем модификация путем комбинирования известных антисептиков с комплексообразующими веществами. Примером такого подхода служит изученное в настоящей работе ДС «Тригексилон» – комплексный антисептик на основе хлоргексидина (ХГ), обладающий более высокой биоцидной активностью и более широким спектром действия по сравнению с ХГ. Активное вещество представляет собой трехкомпонентный комплекс ХГ с хлоридом цинка и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), Методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и масс-спектрометрии установлена бихелатная структура данного комплекса, образованного двухзарядным катионом хлоргексидиния, двухзарядным катионом цинка и четырехзарядным анионом ЭДТА. В растворах, по данным электронной микроскопии, комплексный антисептик ХГ-Zn-ЭДТА образует надмолекулярные агрегаты размером 50-150 нм, что позволяет отнести его к нанодезинфектантам. Результаты изучения механизма антимикробной активности на штамме *Pseudomonas aeruginosa*, позволяет предполагать, что препарат воздействует на клеточную оболочку бактерий, что приводит к повреждению внешней мембраны с последующим распадом клетки.

Цель исследования. Изучение молекулярной структуры и механизма антимикробного действия нового трехкомпонентного комплекса на основе хлоргексидина, цинка и этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Материалы и методы. Исследуемое вещество представляет собой комплекс Хлоргексидин-цинк-ЭДТА (дезинфицирующее средство «Тригексилон» с концентрацией раствора 0.2% в пересчете на хлоргексидин). Структуру комплекса исследовали в кристаллическом состоянии методом рентгеноструктурного анализа на дифрактометре Rigaku SynergyS, в растворах - методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации – масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС) с помощью масс-спектрометра ultrafleXtreme (Bruker Daltonics), элементного анализа и методом просвечивающей электронной микроскопии.

Результаты. Впервые проведено рентгеноструктурное исследование комплекса ХГ-Zn-ЭДТА и установлена его тонкая молекулярная структура в кристаллическом состоянии. Комплекс представляет собой стабильную бихелатную электронейтральную систему, в которой молекула хлоргексидина принимает компактную конформацию, стабилизированную за счет взаимодействия с анионным цинк-ЭДТА фрагментом. В растворах комплекс агрегирует, образуя наночастицы размером 50-150 нм. Полученные данные указывают, что антисептический эффект комплекса ХГ-Zn-ЭДТА связан с повреждающим воздействием на клеточные мембраны.

Заключение. Структура и свойства биоцидного трехкомпонентного комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, представляющего собой стабильную бихелатную систему, существенно отличают его от свободного хлоргексидина. В растворах комплекс представлен наночастицами размером 50-150 нм, что позволяет отнести его к нанодезинфектантам. Антисептический эффект комплекса ХГ-Zn-ЭДТА реализуется через клеточные мембраны, его повышенная активность, вероятно, объясняется малым молекулярным объемом, высокой подвижностью и склонностью к образованию надмолекулярных структур. Все это служит основанием для дальнейшего изучения механизмов биоцидного действия комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, который представляется перспективной основой для получения высоко эффективных дезинфицирующих средств.

Ключевые слова: хлоргексидин, комплекс, цинк, ЭДТА, дезинфицирующее средство, наночастицы, электронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ, масс-спектры МАЛДИ ультраструктура бактерий.

THE STRUCTURE AND MECHANISM OF ANTIMICROBIAL ACTION OF THE COMPLEX COMPOUND CHLORHEXIDINE, A NEW REPRESENTATIVE OF NANODESINFECTANTS

Galinkin V.A.¹ Enikeev A.H.¹, Krasnov K.A.², Gladchuk A.S.², Gerasimov V.N.³,
Khrustalev V.N.⁴

1 – ROSBIO LLC, 192019, Russia, St. Petersburg, 10-A Melnichnaya str. 7731254@mail.ru

2 – Federal State Budgetary Institution «Scientific and Clinical Center of Toxicology named after

academician S.N. Golikov of the Federal Medical and Biological Agency, 192019, Sankt-Peterburg, str. Behtereva, 1, institute@toxicology.ru, krasnov_tox@mail.ru

3 – Federal State Budgetary Institution "State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology" of Rospotrebnadzor 142279, Moscow region, Serpukhov district, village Obolensk, FBUN SSC PMB, ilcvngerasimov@obolensk.org

4 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia" Miklukho-Maklay str., 6

ABSTRACT

Introduction. The formation of resistance of pathogenic microorganisms to known disinfectants (DA) requires constant improvement of the arsenal of DA. The effectiveness of DA can be increased by modification by combining known antiseptics with complexing agents. An example of this approach is the DA "Trihexilon" studied in this work – a complex antiseptic based on chlorhexidine (HCG), which has a higher biocidal activity and a wider spectrum of action compared with HCG. The active substance is a three-component complex of HCG with zinc chloride and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), the methods of X-ray diffraction (XRD) and mass spectrometry have established the bichelate structure of this complex, formed by a two-charge chlorhexidinium cation, a two-charge zinc cation and a four-charge EDTA anion, In solutions, the complex aggregates to form nanoparticles of 50-150 nm in size. The data obtained indicate that the antiseptic effect of the HCG-Zn-EDTA complex is associated with a damaging effect on cell membranes.

The aim of the study. To study the molecular structure and mechanism of antimicrobial action of a new three-component complex based on chlorhexidine, zinc and ethylenediaminetetraacetic acid.

Materials and methods. The substance under study is a complex of Chlorhexidine-zinc-EDTA (disinfectant "Trihexilon" that contain of 0.2% in terms of chlorhexidine in the solution). The structure of the complex was studied in the crystalline state by X-ray diffraction analysis on a Rigaku SynergyS diffractometer, in solutions by matrix-activated laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using an UltrafleXtreme mass spectrometer (Bruker Daltonics), elemental analysis and transmission electron microscopy. Microbiological studies were carried out using a test culture of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria ATCC 27853B, the bactericidal activity of the drug was studied by electron microscopic methods using a TecnaiG2 SpiritBioTWIN tracer electron microscope. The degree of damage to the ultrastructure of microorganisms was assessed on the basis of cytostructural criteria, the viability of bacterial cells was assessed by microbiological method.

Outcomes. For the first time, an X-ray diffraction study of the Chlorhexidine-Zn-EDTA complex was carried out and its fine molecular structure in the crystalline state was established. The complex is a stable bis-chelate electroneutral system in which the chlorhexidine molecule adopts a compact conformation stabilized by interaction with an anionic zinc-EDTA fragment. In solutions, the complex aggregates to form nanoparticles of 50-150 nm in size. The data obtained

indicate that the antiseptic effect of the Chlorhexidine-Zn-EDTA complex is associated with a damaging effect on cell membranes.

Conclusion. The structure and properties of the biocidal three-component complex Chlorhexidine-Zn-EDTA, which is a stable bichelate system, significantly distinguish it from free chlorhexidine. In solutions, the complex is represented by nanoparticles of 50-150 nm in size, which makes it possible to classify it as nanodesinfectants. The antiseptic effect of the Chlorhexidine-Zn-EDTA complex is realized through cell membranes, its increased activity is probably due to its small molecular volume, high mobility and tendency to form supramolecular structures. All this serves as a basis for further study of the mechanisms of the biocidal action of the Chlorhexidine-Zn-EDTA complex, which seems to be a promising basis for obtaining highly effective disinfectants.

Key words: chlorhexidine, complex, zinc, EDTA, disinfectant, nanoparticles, electron microscopy, X-ray diffraction analysis, MALDI mass spectra, bacterial ultrastructure.

ВВЕДЕНИЕ

Микробная угроза, как отмечается в докладах ВОЗ, может стать одной из главных проблем, которые придется решать человечеству в XXI веке. Медицина может оказаться бессильной перед возбудителями разнообразных инфекций, резистентных к существующим дезинфицирующим средствам (ДС) [1]. Формирование резистентности, а также появление перекрестной, или «комбинированной» лекарственной устойчивости считается наиболее опасным последствием адаптации патогенных микроорганизмов к антибиотикам и ДС [2, 3].

Для повышения эффективности дезинфекционных процедур возможны несколько подходов [3]. Важно внедрять принципиально новые ДС, однако разработка таких средств является длительным и дорогостоящим процессом. Быстрее и экономичнее разрабатывать новые композиции на основе известных противомикробных соединений, Комбинированные средства, обычно содержащие действующие вещества с разным механизмом действия, имеют несколько мишеней в клетке и поэтому микроорганизмам гораздо сложнее к ним адаптироваться. Это позволяет значительно повысить эффективность препарата и нивелировать недостатки индивидуальных биоцидов. Другая возможность для повышения эффективности существующих антисептиков состоит в том, чтобы перевести препарат в форму устойчивого комплекса, в котором активное вещество приобретет новые физико-химические и биологические свойства. Такой подход был использован при разработке ДС «Тригексилон», действующим веществом которого является хлоргексидин (ХГ) в форме комплексного соединения с цинком и этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Это привело к резкому усилению биоцидного эффекта и расширению спектра активности по сравнению с исходным ХГ [4].

Как известно, ХГ является одним из наиболее широко применяемых местных антисептиков в медицине, ветеринарии и бытовой практике [5, 6]. Структурная формула ХГ представлена на рисунке 1.

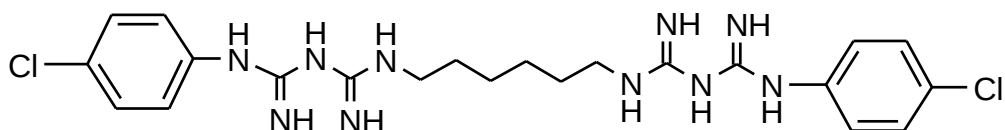


Рисунок 1 - Химическая структура хлоргексидина

Молекула хлоргексидина состоит из двух симметричных хлорфенилзамещенных бигуанидовых групп, соединённых гидрофобной гексаметиленовой цепочкой, при физиологическом значении pH существует в виде бикатиона [7]. Механизм антимикробного действия хлоргексидина, как и у большинства катионных антисептиков, реализуется на уровне клеточной мембраны. [6]. Бикатион хлоргексидина прочно адсорбируется на микробной стенке, связывая анионные центры (сульфатные, фосфатные и карбоксильные группы) мембранообразующих протеинов, фосфолипидов и полисахаридов. При биоцидных концентрациях происходит нарушению структуры клеточной мембраны, что в конечном итоге ведёт к гибели бактериальных клеток [7]. ХГ приобрел широкую популярность благодаря своей универсальности, высокой бактерицидной активности в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая грибы, а также за счет способности сохранять высокую активность при контакте с различными биологическими субстратами (кровь, слюна, гной и т.п.) [6].

Вместе с тем, ХГ обладает рядом существенных недостатков. В частности, при комнатной температуре он практически не действует на бактериальные споры и поэтому малоэффективен против спорообразующих патогенов [8], кислотоустойчивых микроорганизмов [9], к числу которых относятся возбудители туберкулеза и проказы. Также, серьезным недостатком ХГ является его относительно слабая вирулицидная активность [10, 11]. Наконец, повсеместное использование ХГ приводит к появлению резистентных микроорганизмов, например, известны штаммы *K. pneumoniae* практически нечувствительны к рекомендуемым концентрациям антисептика [12].

Как показано нами в работе [4], включение ХГ в состав трехкомпонентного комплекса с цинком и ЭДТА приводит к значительному (в 3-5 раз) повышению биоцидной активности по отношению к патогенным микроорганизмам бактериальной и грибковой природы, а также к расширению спектра действия. Комплекс эффективен против штаммов, резистентных к ХГ, а также, в отличие от ХГ, обладает выраженным вирулицидным действием в отношении возбудителей парентеральных вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции, герпеса, ротавируса гастроэнтерита, энтеровирусных инфекций, гепатита А, полиомиелита, гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. Особо следует отметить появление выраженной туберкулостатической активности, причем не только *in vitro*, но и *in vivo* [4]. Все это служит серьезной причиной для дальнейшего изучения структуры и биологических свойств комплексного антисептика ХГ-Zn-ЭДТА.

По данным масс-спектров было установлено, что компоненты данного комплекса - катионы ХГ, цинка и анион ЭДТА присутствуют в стехиометрическом соотношении,

образуя электронейтральную молекулу, чем объясняется ее стабильность [4]. Однако пространственная молекулярная структура тройного комплекса ХГ, как и механизм его биоцидного действия, до настоящего времени не были рассмотрены. Эти принципиальные вопросы удалось осветить в ходе отдельного исследования, представленного в настоящей работе.

Цель работы. Изучение молекулярной структуры и механизма антимикробного действия нового трехкомпонентного комплекса на основе хлоргексидина, цинка и этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Материалы и методы

Исследуемое вещество. Водный раствор исследуемого комплекса Хлоргексидин-цинк-ЭДТА ((дезинфицирующее средство «Тригексилон») предоставлен ЗАО «Росбио», концентрация раствора составляла 0.2% в пересчете на хлоргексидин. Моноизотопная масса негидратированной молекулы комплекса ХГ-Zn-ЭДТА составляет 858.3.

Рентгеноструктурное исследование. Монокристаллы индивидуального комплекса ХГ-Zn-ЭДТА для исследования методом РСА получали, упаривая 200 мл исходного ДС «Тригексилон» в вакууме до остаточного объема 50 мл и выдерживали раствор в течение 2 суток при комнатной температуре. Выделившийся кристаллический продукт промывали водой и подсушивали 30 мин на воздухе. Получали бесцветные призматические кристаллы с брутто-формулой $C_{32}H_{56}Cl_2N_{12}O_{14}Zn$ (гидрат).

Параметры элементарной ячейки и интенсивности отражений для кристалла измерены на четырехкружном монокристалльном дифрактометре Rigaku SynergyS, оснащенном двухкоординатным гибридным детектором HyPix 6000 HE ($\lambda(CuK\alpha)$ -излучение, $T = 100$ К, графитовый монохроматор, φ - и ω -сканирование). Обработка экспериментальных данных и учет поглощения рентгеновского излучения проведены с помощью программы CrysAlisPro [13]. Структура определена прямыми методами и уточнена полноматричным методом наименьших квадратов по F^2 в анизотропном приближении для неводородных атомов. Атомы водорода аминогрупп и сольватных молекул воды выявлены объективно в разностных Фурье-синтезах и уточнены изотропно с фиксированными параметрами смещения ($U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(N)$ и $1.5U_{eq}(O)$). Положения остальных атомов водорода рассчитаны геометрически и включены в уточнение с фиксированными позиционными параметрами (модель «наездника») и изотропными параметрами смещения ($U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(C)$ для CH_3 -групп и $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(C)$ для остальных групп). Все расчеты проведены с использованием комплекса программ SHELXTL [14]. Таблицы координат атомов, длин связей, валентных и торсионных углов и анизотропных параметров смещения для соединения $1 \cdot 6H_2O$ депонированы в Кембриджском Банке Структурных Данных.

Масс-спектрометрическое (МС) исследование. МС исследование комплекса ХГ-Zn-ЭДТА осуществляли методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации – масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС) с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра ultrafleXtreme (Bruker Daltonics) на базе Научного

парка СПбГУ. К 10 мкл 0.1%-ного раствора комплекса добавляли 100 мкл 0.1%-ного раствора 3,4-дигидроксиацетофенона (МАЛДИ-матрицы) в водном метаноле 50%. Полученный раствор в количестве 1 мкл наносили на стандартную МАЛДИ мишень и высушивали при комнатной температуре, после чего снимали МАЛДИ масс-спектр в режиме «рефлектор» с регистрацией положительных ионов в диапазоне m/z 600–1500. Для одного спектра суммировалось 15 000 актов облучения образца лазером (Nd:YAG 355 нм). Для калибровки масс-спектрометра использовали калибровочную смесь Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics; Германия).

Элементный анализ. Элементный состав комплекса хлоргексидин-ЭДТА-Zn устанавливали стандартным методом (CHN анализ). Количественное содержание цинка определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, используя спектрометр Optima 2100DV (Perkin Elmer; США). Элементный состав безводного комплекса ХГ-Zn-ЭДТА по данным элементного анализа: найдено С — 44,50%, Н — 5,21%, N — 19,44%, Zn — 7,57% соответствуют вычисленным для соединения с брутто-формулой $C_{32}H_{44}Cl_2N_{12}O_8Zn$.

Просвечивающая электронная микроскопия. Для визуализации в просвечивающем электронном микроскопе водного раствора (1% и 10 % по препарату) дезинфицирующего средства «Тригексилон» (комплекс Хлоргексидин-цинк-ЭДТА) раствор наносили на медные сеточки, покрытые формваровой пленкой и контрастировали 1 % водным раствором уранилацетата. Приготовленные образцы средства просматривали в электронном микроскопе Теснаі G2 Spirit BioTWIN при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 5000 до 40000 крат.

Методы микробиологических исследований. В качестве тестируемого микроорганизма выбрана культура бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853В, полученная из коллекции микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск.

Для приготовления рабочих суспензий бактерий суточные культуры с агаризованных сред смывали стерильным физиологическим раствором и разбавляли до концентрации 1×10^{10} кл/см³, что соответствует БАК-10 по оптическому стандарту мутности.

Изучение бактерицидной активности препарата. Микробные клетки *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 (титр исходной культуры $1,0 \times 10^9$ кл/см³) обрабатывали раствором комплекса ХГ-Zn-ЭДТА с концентрацией 100 мкг/мл в пересчете на хлоргексидин. Концентрация раствора дезинфектанта была выбрана такой, при которой имелась возможность с течением времени в процессе обработки наблюдать динамику разрушения клеток, которая регистрировалась электронно-микроскопическими методами.

Жизнеспособность бактериальных клеток до и после воздействия препарата оценивали микробиологическим методом [15].

Исследование ультраструктуры микроорганизмов методом электронной микроскопии. Центрифугированную биомассу микробных клеток обрабатывали 8%

раствором глютарового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере (pH 7.2) и выдерживали 12 ч при 4 °С. Дополнительную фиксацию бактерий проводили в 4 % водном растворе четырехоксида осмия на буфере Райтер-Келенбергера в течение ночи при 4 °С. После фиксации и отмывки в буфере образцы биомассы бактерий дегидратировали по 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и 20 мин в абсолютном спирте при его трехкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношения 3:1; 1:1; 1:3) при 37 °С в течение суток, переносили в чистый аралдит, выдерживали в вакууме (10^{-2} торр) 1,5 часа при температуре 37 °С. Заливали образцы аралдитом и полимеризовали при 40 °С в течение ночи, затем при 60 °С – 24 ч и затем при 90 °С – двое суток. Срезы фиксированной биомассы бактерий получали на ультрамикротоме Ultracut (ReichertJung, Австрия). Срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе TecnaiG2 SpiritBioTWIN (FEI, Голландия, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10000 до 100000 крат. Фотосъёмку электронно-микроскопических изображений производили с помощью CCD камеры высокого разрешения GatanOriusSC 200W 120 kV, а также – CCD камеры GatanOriusSC 1000B 200kV. Обработку фотоснимков производили с помощью программ TecnaImaging and Analysis, Gatan digital micrograph. Степень повреждения ультраструктуры микроорганизмов оценивали на основе цитоструктурных критериев [16].

Результаты и обсуждение

В кристаллическом состоянии комплекс ХГ-Zn-ЭДТА, исследованный методом РСА, представляет собой (1,6-ди-[бис-(4-хлорфенилбигуанидо)]гексана-цинка этилендиамин-тетраацетат гексагидрат. Параметры кристаллической структуры приведены в таблице 1, молекулярная структура изображена на рисунке 1.

Таблица 1 - Кристаллоструктурные данные и параметры уточнения молекулы ХГ-Zn-ЭДТА

Параметр	Значение
Элементный состав	$C_{32}H_{56}Cl_2N_{12}O_{14}Zn$
Молекулярная масса	969.18
Температура, К	100.0(2)
Размеры кристалла, mm	0.22×0.23×0.32
Сингония	Моноклинная
Пространственная группа	$P2_1/n$
a , Å	14.80715(5)
b , Å	14.77717(5)
c , Å	20.99393(7)
α , °	90
β , °	106.8765(4)
γ , °	90

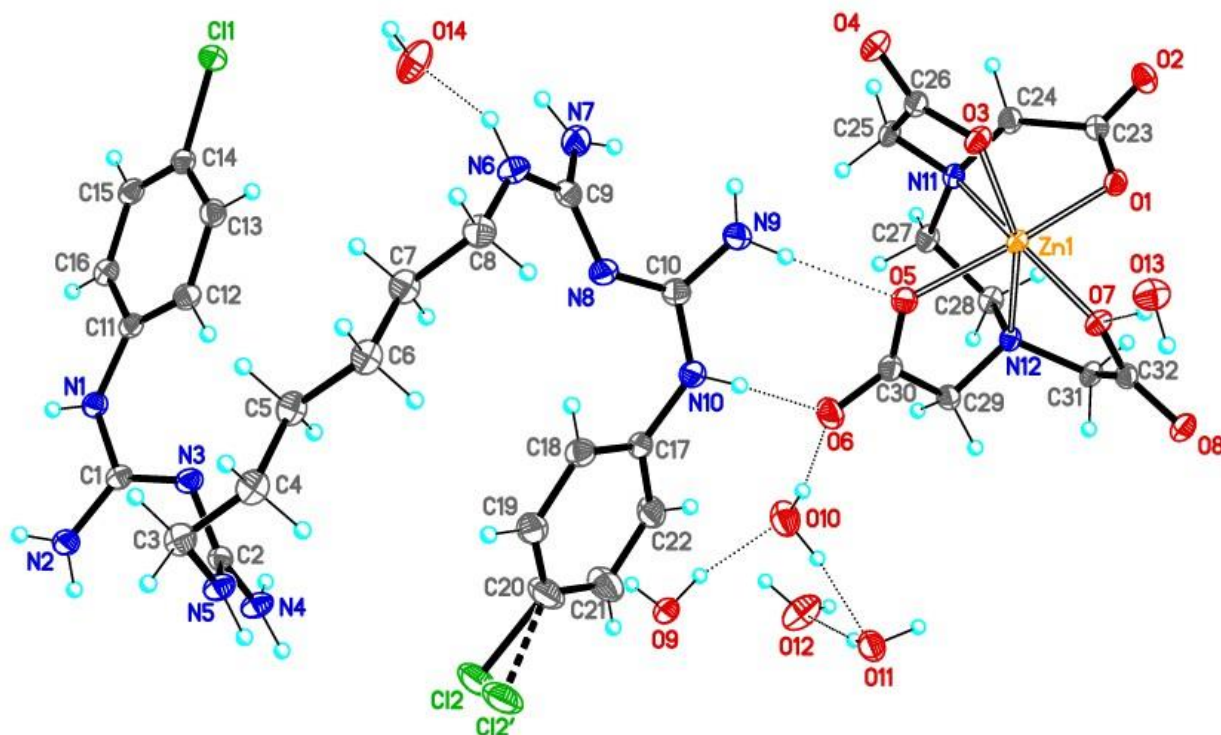


Рисунок 1. Молекулярная ORTEP структура комплекса ХГ-Zn-ЭДТА

Кристаллы трехкомпонентного комплекса имеют стехиометрический состав. Структурными компонентами являются хлоргексидин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и катион цинка, которые присутствуют в эквимольном соотношении. В состав кристаллов также входят 6 молекул гидратной воды, других лигандов в кристалле нет. Кристаллическая ячейка содержит центральный четырехкоординированный двухзарядный катион цинка, двухзарядный катион хлоргексидиния и четырехзарядный анион полностью депротонированной молекулы ЭДТА. В катионе хлоргексидиния протонированы периферические иминогруппы гуанидиновых фрагментов у атомов углерода C4 и C4' (рисунок 1). Молекула хлоргексидина скручена в пространстве в компактную структуру, которая удерживается в кристаллической ячейке за счет электростатического взаимодействия с анионным Zn-ЭДТА фрагментом. Катион цинка, полностью экранированный четырехзарядным анионом ЭДТА, присутствует в составе металлоорганического комплексного аниона с суммарным зарядом (-2). В целом трехкомпонентный комплекс электронейтрален. Его стабильность можно объяснить внутримолекулярным хелатообразованием, в результате которого катионные и анионные фрагменты в данной системе стехиометрически уравнивают друг друга, образуя в сумме электронейтральную молекулу.

Несмотря на присутствие воды, комплекс выглядит слабо сольватированным. Большинство молекул воды заполняют межмолекулярное пространство, не образуя выраженных водородных связей, что указывает на достаточно высокую гидрофобность данного комплекса.

Ниже на рисунке 2 изображены молекулярные структуры свободного хлоргексидина и комплекса ХГ-Zn-ЭДТА в 3D формате.

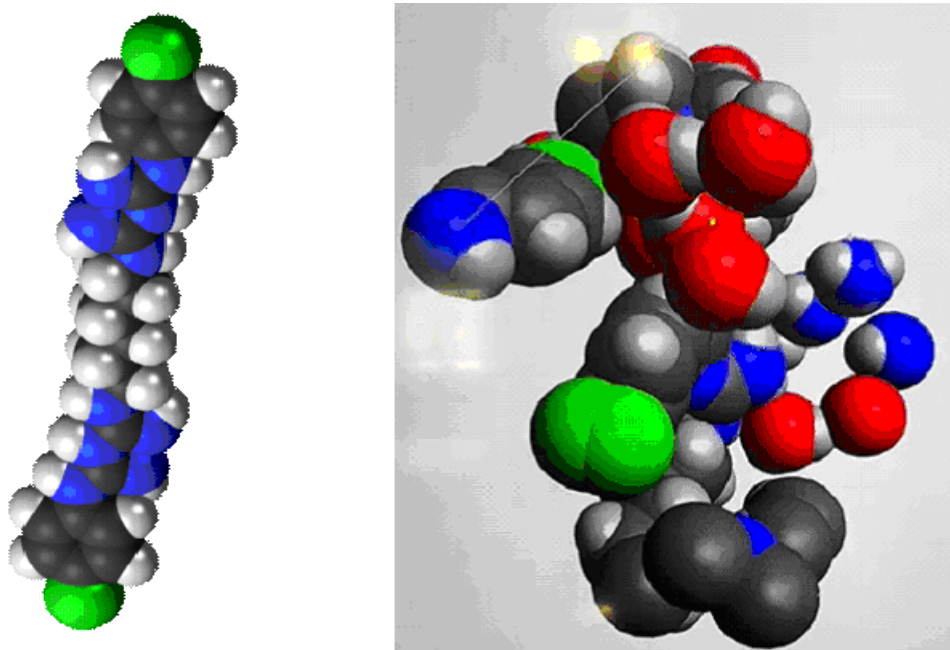


Рисунок 2 – Молекулы хлоргексидина (слева) и комплекса ХГ-Zn-ЭДТА (справа) в 3D формате. Зеленым цветом обозначены атомы хлора; синим - азота, красным - кислорода, черным - углерода, белым - водорода, желтым - атом цинка

При сравнении структур на рисунке 2 видно, насколько различаются пространственные конформации хлоргексидина в чистом виде и составе комплекса ХГ-Zn-ЭДТА. Очевидно, что такая трансформация геометрии молекулы хлоргексидина под действием комплексообразования может существенным образом изменить его физико-химические свойства и характер взаимодействия с биологическими мишенями, а, следовательно, и биологическую активность.

Стабильность комплекса ХГ-Zn-ЭДТА в растворах была подтверждено методами МАЛДИ-МС и просвечивающей электронной спектроскопией. В масс-спектрах присутствует высоко интенсивный сигнал тройного комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, зарегистрированного в виде протонированного иона MH^+ 859.3 Да. На рисунке 3 представлен фрагментный масс-спектр этого иона, где размечены пики составных компонентов тройного комплекса.

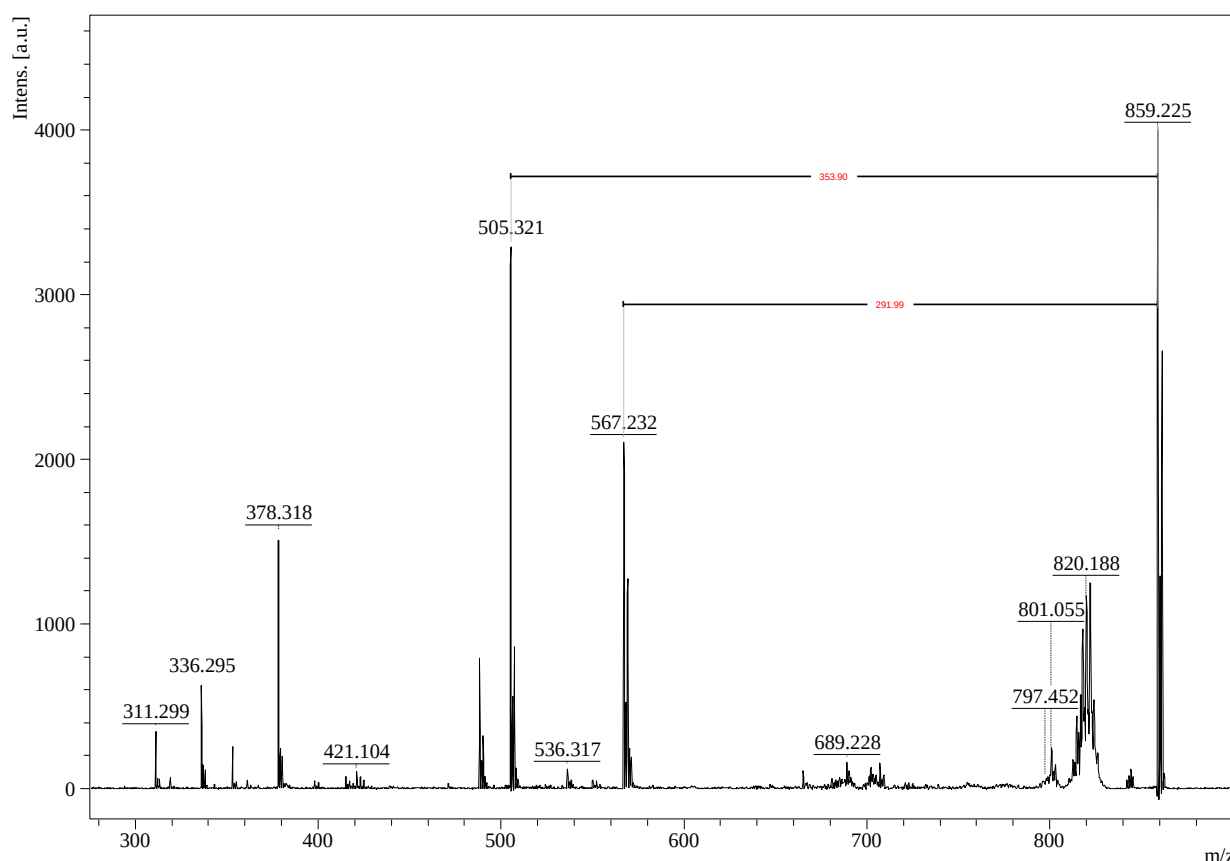


Рисунок 5 – Фрагментный масс-спектр комплекса $[\text{XГ-Zn-ЭДТА}]\text{H}^+$ (m/z 859.23 Да). Отмеченные пики соответствуют фрагментам: $(\text{XГ})\text{H}^+$ m/z 505,32; $(\text{XГ} + \text{Zn})\text{H}^+$ m/z 567,23

Масс-спектр на рисунке 3 доказывают включение хлоргексидина в состав прочного тройного комплекса с участием ЭДТА и цинка. Судя по относительной интенсивности массового иона m/z MH^+ 859.3 а также по характеру его фрагментации, получаемый комплекс отличается высокой стабильностью, сопоставимой с устойчивостью бинарного комплекса ЭДТА-Zn.

Исследования водных растворов комплекса ХГ-Zn-ЭДТА на просвечивающем электронном микроскопе показали, что такие растворы представляют сложную двухфазную систему, состоящую из жидкой и твердой фаз. Активное вещество представлено свободно распределенными структурными образованиями неопределенной формы диаметром 50-150 нм и многочисленными более мелкими агрегатами. Все эти надмолекулярные структуры, вероятно, относятся к бихелатному комплексу так как аналогичный анализ растворов солей хлоргексидина в отсутствие комплексообразователя не позволил визуализировать какие-либо структурные образования. Таким образом, биоцидный комплекс ХГ-Zn-ЭДТА существует в растворах в виде наночастиц, что позволяет его к нанодезинфектантам.

Наглядная демонстрация изменений, происходящих с бактериальными клетками, была получена при анализе электронно-микроскопических изображений, позволяющих наблюдать трансформацию клеток *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 в процессе воздействия дезинфицирующего средства (Рисунок 4).

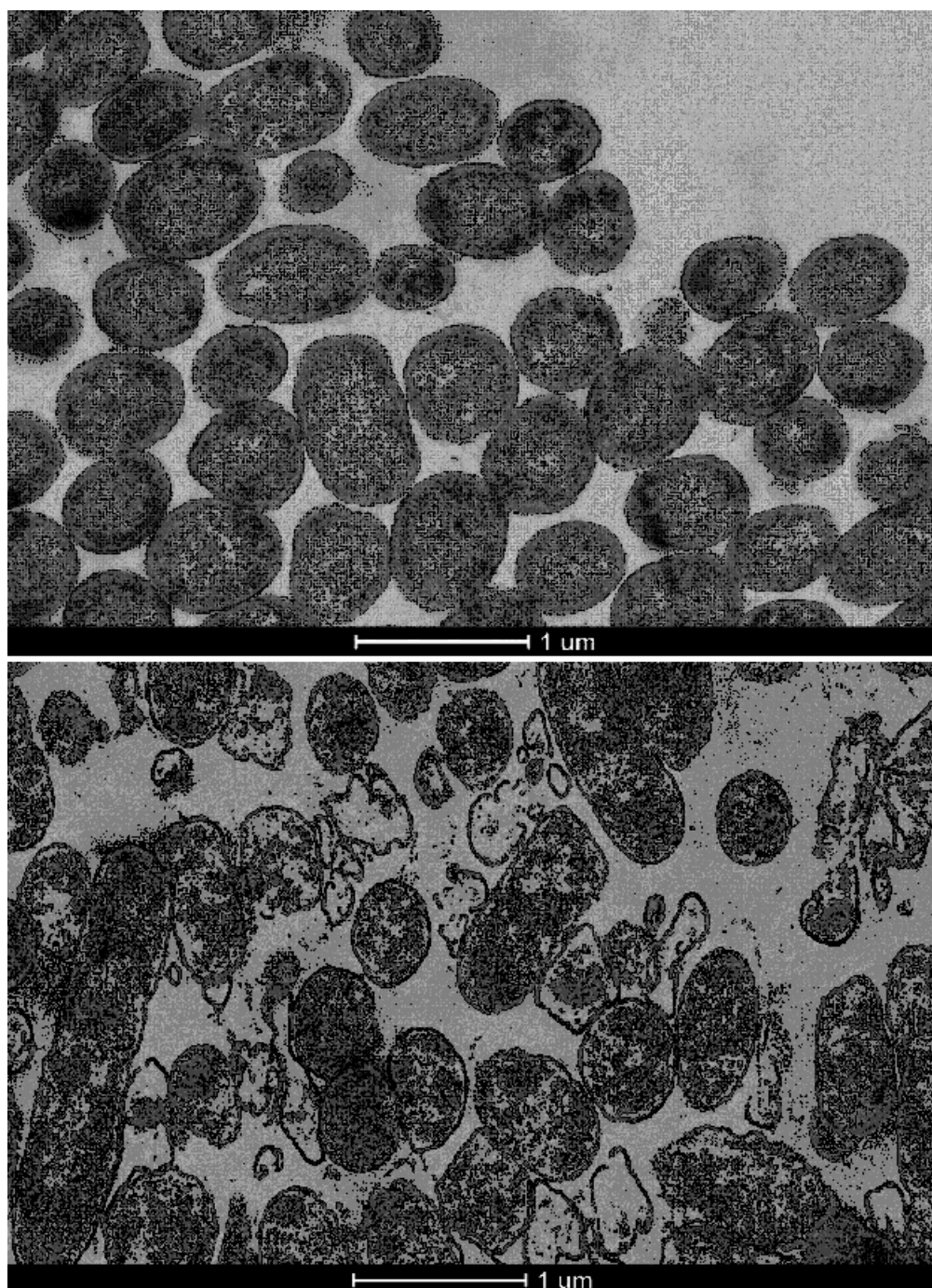


Рисунок 4 - Электронно-микроскопические изображения ультратонких срезов бактерий *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 до воздействия (А) и после 60 мин воздействия дезинфектанта. Увел. 35000 крат.

Клетки исходной (контрольной) культуры *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 имеют тонкую структуру, типичную для грамотрицательных бактерий: клеточная оболочка, состоящая из тонкой, слегка извилистой внешней мембраны, тонкого пептидогликанового слоя и сравнительно гладкой цитоплазматической мембраны, гомогенной цитоплазмы, упакованной различными глобулярными и фибриллярными компонентами. Внутриклеточный мембранный аппарат клетки слабо развит (Рисунок 4).

При воздействии разбавленного раствора комплекса ХГ-Zn-ЭДТА (с концентрацией 100 мкг/мл в пересчете на хлоргексидин) через 30 мин происходит заметное изменение состояния бактерий, фиксируются нарушения клеточных оболочек у отдельных бактерий, титр культуры снижается примерно на 30 %. Через 60 мин воздействия антисептика (рисунок 4, Б) число клеток с необратимыми повреждениями оболочки составляет 98% от общего числа, а у остальных клеток фиксируются обратимые повреждения оболочек. Полная инактивация микроорганизмов наблюдается после 90 мин инкубации с антисептиком.

Эти результаты указывают, что в основе механизма биоцидного действия комплекса ХГ-Zn-ЭДТА на бактериях, по всей вероятности, лежит взаимодействие молекул и/или наночастиц препарата с клеточной оболочкой бактерий. Связываясь с внешней мембраной, препарат изменяет ее свойства, приводя в конечном итоге к разрыву в клеточной оболочке и лизису бактериальной клетки. Механизм биоцидного действия свободного хлоргексидина в принципе аналогичен, однако, как уже отмечено выше, трехкомпонентный комплекс ХГ-Zn-ЭДТА более активен и обладает более широким спектром действия. Можно предположить, учитывая склонность молекул комплекса ХГ-Zn-ЭДТА к агрегации, что мембранотропные свойства у него выражены сильнее, чем у свободного ХГ. Хлоргексидиновый фрагмент может связываться с анионными центрами мембраны, а ЭДТА-хелатированный цинк - с катионными центрами, что дает в сумме более высокую энергию взаимодействия с мембраной. Вероятно, также, что немаловажную роль играет компактная форма молекулы комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, благодаря чему возможна диффузия активного вещества внутрь клетки и воздействие на внутренние цитоплазматические мембраны (способность комплекса ХГ-Zn-ЭДТА проникать через биологические мембраны, нехарактерная для свободного хлоргексидина, была отмечена нами для в работе [4]).

Заключение

Структура и свойства биоцидного трехкомпонентного комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, представляющего собой стабильную бихелатную систему, существенно отличают его от свободного хлоргексидина. В растворах комплекс представлен наночастицами размером 50 -150 нм, что позволяет отнести его к нанодезинфектантам. Антисептический эффект комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, как и у свободного хлоргексидина, связан с повреждающим воздействием препарата на клеточные мембраны. При этом комплекс обладает рядом специфических особенностей, вероятно, обусловленных его структурой. В частности, высокая активность и биоцидная универсальность трехкомпонентного комплекса может объясняться его малым молекулярным объемом и соответственно, повышенной подвижностью, а также со склонностью к образованию надмолекулярных структур. Все это служит основанием для дальнейшего изучения механизмов биоцидного действия комплекса ХГ-Zn-ЭДТА, который представляется перспективной основой для получения высоко эффективных дезинфицирующих средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Распоряжение Правительства РФ от 25.09.2017 № 2045-р «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года»
2. Фёдорова Л.С., Ильякова А.В. Актуальные вопросы резистентности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам. *Дезинфекционное дело*. 2022; 4(122): 50–54.
- 3 Юдин М.А., Степанов А.В., Богачева А.С. и др. Перспективные подходы к преодолению антибиотикорезистентности. *Medline.ru*. 2024; 25(1): 49–70.
4. Галынкин В.А., Еникеев А.Х., Подольская А.С. и др. Антимикробная и вирулицидная активность трехкомпонентного комплекса хлоргексидин-ЭДТА-цинк. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2022; 1(24): 43–50.
5. Квашнина Д.В., Ковалишена О.В. Оценка применения хлоргексидина как антисептического средства. *Медицинский альманах*. 2016; 43(3): С. 62–66
6. Зверьков А.В., Зузова А.П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. *Антимикробные препараты*. 2013; 15(4): 279–285.
7. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl Microbiol*. 2005; 99: 703–715.
8. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. 16-е изд. М.: Новая волна; 2012.
9. Junco-Lafuente, M.P., Baca-García, P., Mesa-Aguado, F.L. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*. 2001; 6: 81–89.
10. Jones C. G. Chlorhexidine: Is It Still the Gold Standard? *Periodontol* 1997; 15: 55–62.
- 11 Carrouel F., Conte M.P., Fisher J. at all. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses With β -Cyclodextrin Combined With Citrox in Preventing Infection and Progression. *J. Clin Med*. 2020; 9: 1126.
12. Wand M.E., Bock L.J., Bonney L.C., Sutton J.M. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017; 61: e01162-16.
13. CrysAlisPro, Version 1.171.41.106a. Oxford Diffraction, 2021.
14. Sheldrick G.M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr*. 2015; 71: 3–8.
15. Руководство Р 4.2.3676-20 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности», М., 2020.
16. Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С. Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток бактерий и микробной популяции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(4): 237–244.

References

1. Rasporjazhenie Pravitel'stva RF ot 25.09.2017 № 2045-r «Strategija preduprezhdenija rasprostraneniya antimikrobnnoj rezistentnosti v Rossijskoj Federacii na period do 2030 goda»
2. Fjodorova L.S., Il'jakova A.V. Aktual'nye voprosy rezistentnosti mikroorganizmov k dezinficirujushhim sredstvam. *Dezinfekcionnoe delo*. 2022; 4(122): 50–54.
3. Judin M.A., Stepanov A.V., Bogacheva A.S. i dr. Perspektivnye podhody k preodoleniju antibiotikorezistentnosti. *Medline.ru*. 2024; 25(1): 49–70.
4. Galynkin V.A., Enikeev A.H., Podol'skaja A.S. i dr. Antimikrobnaja i virulicidnaja aktivnost' trehkomponentnogo kompleksa hlorgeksidin-JeDTA-cink. *Medicina jekstremal'nyh situacij*. 2022; 1(24): 43–50.
5. Kvashnina D.V., Kovalishena O.V. Ocenka primenenija hlorgeksidina kak antisepticheskogo sredstva. *Medicinskij al'manah*. 2016; 43(3): S. 62–66
6. Zver'kov A.V., Zuzova A.P. Hlorgeksidin: proshloe, nastojashhee i budushhee odnogo iz osnovnyh antiseptikov. *Antimikrobnye preparaty*. 2013; 15(4): 279–285.
7. Gilbert P., Moore L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl Microbiol*. 2005; 99: 703–715.
8. Mashkovskij M.D. *Lekarstvennye sredstva*. 16-e izd. M.: Novaja volna; 2012.
9. Junco-Lafuente, M.P., Baca-García, P., Mesa-Aguado, F.L. Utilización de la clorhexidina en la prevención oral de pacientes de la tercera edad. *Revista del Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*. 2001; 6: 81–89.
10. Jones C. G. Chlorhexidine: Is It Still the Gold Standard? *Periodontol* 1997; 15: 55–62.
11. Carrouel F., Conte M.P., Fisher J. at all. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses With β -Cyclodextrin Combined With Citrox in Preventing Infection and Progression. *J. Clin Med*. 2020; 9: 1126.
12. Wand M.E., Bock L.J., Bonney L.C., Sutton J.M. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017; 61: e01162-16.
13. CrysAlisPro, Version 1.171.41.106a. Oxford Diffraction, 2021.
14. Sheldrick G.M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr*. 2015; 71: 3–8.
15. Rukovodstvo R 4.2.3676-20 «Metody laboratornyh issledovanij i ispytanij dezinfekcionnyh sredstv dlja ocenki ih jeffektivnosti i bezopasnosti», M., 2020.
16. Gerasimov V.N., Marinina N.N., Harseeva G.G., Shherbataja O.S. Vozmozhnosti transmissionnoj jelektronnoj mikroskopii v ocenke kachestva kletok bakterij i mikrobnnoj populjacii. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2022; 67(4): 237–244.