АНТИМИКРОБНАЯ И ВИРУЛИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРЕХКОМПОНЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ХЛОРГЕКСИДИН-ЭДТА-ЦИНК

В. А. Галынкин[1], А. Х. Еникеев[1], Е. П. Подольская[2,3], А. С. Гладчук[2,4], Т. И. Виноградова[5], Н. В. Заболотных[5], М. З. Догонадзе[5], К. А. Краснов[2] ✉

[1] ООО «РОСБИО», Санкт-Петербург, Россия

[2] Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

[3] Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург, Россия

[4] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

[5] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Хлоргексидина биглюконат (ХГ) широко используют в качестве дезинфицирующего средства, однако он мало эффективен в отношении спорообразующих микроорганизмов, а также вирусов. Целью работы было повысить биоцидную активность хлоргексидина путем его использования в составе комплекса, включающего этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) и хлорид цинка. Структура трехкомпонентного комплекса ХГ-ЭДТА-цинк доказана методом МАЛДИ-МС, биоцидная активность изучена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что комплекс значительно превосходит индивидуальный хлоргексидин, как по уровню активности, так и по широте биоцидного действия. В отношении изученных бактериальных и грибных штаммов комплекс ХГ-ЭДТА-Zn был в 4–5 раз активнее, чем биглюконат хлоргексидина. В концентрации 1,0–0,008 мг/мл (в зависимости от вида микроорганизма) *in vitro* комплекс проявлял как бактериостатическое, так и бактерицидное действие в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц. В клинических условиях показана его высокая эффективность при лечении дерматитов у мелких домашних и сельскохозяйственных животных; *in vitro* и *in vivo* выявлена высокая противотуберкулезная активность, сопоставимая с препаратом монофлоксацином, в том числе на лекарственно устойчивых штаммах микобактерий. В экспериментах *in vitro* на примере вируса полиомиелита и аденовируса доказано наличие у комплекса ХГ-ЭДТА-Zn вирулицидного действия.

Ключевые слова: хлоргексидин, ЭДТА, цинк, комплекс, МАЛДИ, антисептическая, противотуберкулезная, антивирусная активность

Финансирование: ООО «РОСБИО»

Вклад авторов: В. А. Галынкин — организация микробиологических и вирусологических исследований; А. Х. Еникеев — общее руководство; Е. П. Подольская — масс-спектрометрический анализ; А. С. Гладчук — химико-аналитические исследования; Т. И. Виноградова — руководство исследованиями противотуберкулезной активности; Н. В. Заболотных — изучение противотуберкулезной активности *in vitro*; М. З. Догонадзе — изучение противотуберкулезной активности на животных; К. А. Краснов — обработка и интерпретация данных, подготовка материалов к печати.

Соблюдение этических стандартов: все процедуры с модельными животными были проведены в соответствии с Правилами лабораторной практики и директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EC (2010 г.) о защите животных, используемых для научных целей.

✉ **Для корреспонденции:** Константин Андреевич Краснов
ул. Бехтерева, д. 1/2, к. 54, г. Санкт-Петербург, 199106, Россия; krasnov_tox@mail.ru

Статья получена: 27.12.2021 **Статья принята к печати:** 24.01.2022 **Опубликована онлайн:** 07.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.002

ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF THREE-COMPONENT COMPLEX OF CHLORHEXIDINE-EDTA-ZINC

Galinkin VA[1], Enikeev AKh[1], Podolskaya EP[2,3], Gladchuk AS[2,4], Vinogradova TI[5], Zabolotnykh NV[5], Dogonadze MZ[5], Krasnov KA[2] ✉

[1] OOO "ROSBIO", St. Petersburg, Russia

[2] Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

[3] Institute of Analytical Instrumentation, St. Petersburg, Russia

[4] Saint Petersburg State University, St Petersburg, Russia

[5] Saint-Petersburg State Research Institute of Phtisiopulmonology, St. Petersburg, Russia

Chlorhexidine bigluconate (CHX) is widely used as a disinfectant, but it is not effective against spore-forming microorganisms, as well as viruses. In this work, a method has been found to increase the biocidal activity of chlorhexidine by using it as part of a complex including ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and zinc chloride. The structure of the three-component complex CHX-EDTA-zinc is proved by the MALDI-MS method. The biocidal activity of the chlorhexidine complex has been studied in vitro and *in vivo* experiments. It is shown that the complex is significantly superior to chlorhexidine alone, both in terms of activity level and in the breadth of biocidal action. In relation to the studied bacterial and fungal strains, the CHX-EDTA-Zn complex was 4–5 times more active than chlorhexidine bigluconate. In concentrations from 1.0 mg/ml to 0.008 mg/ml (depending on the type of micro-organism), in vitro the complex showed both bacteriostatic and bactericidal effects against the main pathogens of bacterial diseases of birds. In clinical conditions, the complex has shown high efficiency in the treatment of dermatitis in small domestic and farm animals. Also, in vitro and *in vivo*, the complex showed unexpectedly high antitubercular activity comparable to that of monofloxacin, including on drug-resistant strains of mycobacteria. *in vitro* experiments involving polio virus and adenovirus have shown that the CHX-EDTA-Zn complex possesses virulent action.

Keywords: chlorhexidine, EDTA, zinc, complex, MALDI, antiseptic, anti-tuberculosis, antiviral activity

Funding: OOO "ROSBIO"

Author contribution: Galinkin VA — organization of microbiological and virological research; Enikeev AKh — general management; Podolskaya EP — mass spectrometric analysis, Gladchuk AS — chemical-analytical studies; Vinogradova TI — management of studies of anti-tuberculosis activity; Zabolotnykh NV — study of antitubercular activity *in vitro*; Dogonadze MZ — study of antitubercular activity in animals; Krasnov KA — data processing and interpretation, preparation of the materials for publication.

Compliance with ethical standards: all procedures with animal models were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union (2010) on protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Konstantin A. Krasnov
Bekhtereva, 1/2, k. 54, St. Petersburg, 199106, Russia; krasnov_tox@mail.ru

Received: 27.12.2021 **Accepted:** 12.01.2022 **Published online:** 07.02.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.002

Дезинфицирующие средства повсеместно используют в медицинской практике, в быту и многих других областях человеческой деятельности. Особенно важна роль мероприятий по дезинфекции в условиях эпидемий или при угрозе распространения опасных инфекций, в связи с чем обеспечение медицинских организаций и населения эффективными антисептическими средствами относится к задачам государственной важности. Общими требованиями, предъявляемыми к таким средствам, являются эффективность подавления всех типов патогенной микрофлоры, включая возбудителей микробных, грибковых и вирусных инфекций, а также безопасность для человека и окружающей среды. Существующие препараты лишь частично удовлетворяют этим требованиям, поэтому разработка новых антисептических средств остается актуальной.

К числу наиболее известных антисептиков относится хлоргексидин (1,6-ди-[бис-(4-хлорфенил)бигуанидо]гексана биглюконат), который уже более 60 лет применяют в медицинской, ветеринарной и бытовой практике; до настоящего времени он остается одним из самых востребованных антисептических агентов [1]. Препарат приобрел популярность благодаря своей высокой бактерицидной активности в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, включая грибы, а также за счет способности сохранять высокую активность при соприкосновении с различными биологическими субстратами (кровь, слюна, гной и т. д.) [2].

Молекула хлоргексидина состоит из двух симметричных хлорфенилзамещенных бигуанидовых групп, соединенных гидрофобной гексаметиленовой цепочкой, при физиологическом значении pH существует в виде бикатиона [3]. Механизм антимикробного действия хлоргексидина, как и у большинства катионных антисептиков, реализуется на уровне клеточной мембраны [4].

Хлоргексидин служит активным началом различных дезинфицирующих средств местного назначения, его используют для обработки ран, ожогов, для стерилизации операционного поля, кожных покровов, он входит в состав растворов и ополаскивателей для лечения простудных заболеваний [5]. Хлоргексидин незаменим в стоматологической практике, где он приобрел статус «золотого стандарта», на который в свое время было принято ориентироваться при разработке новых антисептиков [6].

Вместе с тем, хлоргексидин обладает рядом существенных недостатков. В частности, при комнатной температуре он практически не действует на бактериальные споры и поэтому малоэффективен против спорообразующих патогенов [5]. Малочувствительны к хлоргексидину и кислотоустойчивые микроорганизмы [7], к числу которых относят возбудителей туберкулеза и проказы. Серьезным недостатком хлоргексидина является отсутствие у него выраженной вирулицидной активности. Хотя у хлоргексидина отмечается некоторое действие на ВИЧ, герпес 1 и 2, грипп А [2, 5], по отношению к большинству вирусов он обладает слабым эффектом или совсем не проявляет такового, как, например, к коронавирусу SARS-CoV-2, согласно результатам недавних клинических исследований [8].

Наконец, общей проблемой повсеместно используемых препаратов является появление резистентных микробных штаммов. Долгое время считалось, что лекарственная устойчивость микроорганизмов к хлоргексидину не вырабатывается [2], но современные данные опровергают это мнение. Установлено, что, например, *K. pneumoniae* способна адаптироваться к хлоргексидину, что приводит к появлению патогенных штаммов, практически нечувствительных к рекомендуемым концентрациям антисептика [9].

Как показывают наши исследования, антисептическая активность хлоргексидина может быть увеличена за счет его использования в комбинации с другими химическими средствами. В связи с этим представляется интересным изучить целевую активность хлоргексидина в присутствии комплексообразующих вспомогательных веществ: трилона Б (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты, ЭДТА) и хлорида цинка. Соли и комплексы цинка обладают умеренным антимикробным, противогрибковым и противовирусным действием [10], а ЭДТА, хотя не обладает самостоятельной антисептической активностью, но за счет образования устойчивых комплексов с большинством катионов металлов [11] увеличивает проницаемость клеточных мембран для других веществ, в том числе цинка, а возможно, и хлоргексидина. Целью работы было изучить молекулярную структуру нового хлоргексидинового комплекса, а также провести подробное исследование его биоцидных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексное соединение хлоргексидина в виде водного раствора, содержащего 0,2% хлоргексидина биглюконата, 1% натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 0,5% хлорида цинка, предоставлено ООО «Росбио» (СПб).

Масс-спектрометрическое исследование

Анализ осуществляли методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации — масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС). Исходный раствор комплекса разбавляли водой в 100 раз. На ячейку МАЛДИ-мишени наносили 0,5 мкл полученного раствора, добавляли 0,5 мкл раствора матрицы (5 мг/мл) и высушивали. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту, которую растворяли в 70%-м ацетонитриле с добавкой 0,1%-й трифторуксусной кислоты (ТФУ). После высушивания при комнатной температуре образцы анализировали с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра ultrafleXtreme (Bruker Daltonics; Германия) на базе Научного парка СПбГУ.

Масс-спектры регистрировали в диапазоне m/z 600–1500 в режиме «рефлектрон» с детектированием положительных ионов. 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 состав комплекса хлоргексидин-ЭДТА-Zn устанавливали стандартным методом (CHN-анализ), а количественное содержание цинка определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, используя спектрометр Optima 2100DV (Perkin Elmer; США). Для выделения индивидуального комплекса исходный раствор концентрировали упариванием в вакууме до 1/10 от первичного объема, выделившийся кристаллический продукт отделяли, промывали водой и сушили на воздухе

Таблица 1. Антимикробная активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в сравнении с биглюконатом хлоргексидина (ХГ)

Антисептик	Культура					
	Bac. subtilis	*E. coli*	*Bac. mycoides*	*Sac. cerevisiae*	*P. breri-compactum*	*Asp. niger*
	Площадь зоны, свободной от роста, см^2					
Комплекс ХГ-ЭДТА-Zn	16,8	13,7	15,2	16,8	19,4	18,5
ХГ	3,6	4,1	4,1	4,0	4,4	3,6
Индекс активности Комплекс / ХГ	4,7	3,3	3,7	4,2	4,4	5,1

при 40 °С до постоянного веса. Полученный комплекс представлял собой бесцветный мелкокристаллический порошок ограниченно растворимый в воде. В исходном растворе содержалось 0,34% данного комплекса, что в пересчете на чистый хлоргексидин составляло 0,2%. Данные элементного анализа: найдено С — 44,50%, Н — 5,21%, N — 19,44%, Zn — 7,57%. $C_{32}H_{44}Cl_2N_{12}O_8Zn$ — MW 858,21; вычислено С — 44,64%, Н — 5,15%, N — 19,52%, Zn — 7,60%. Данные масс-спектра МАЛДИ-МС: m/z 859,27.

Микробиологические исследования *in vitro* и *in vivo*

Эксперименты *in vitro* и клинические испытания антисептических свойств комплекса хлоргексидин-ЭДТА-Zn на животных проводили на базе УО «Витебская ордена «Знак почета» Государственная Академия ветеринарной медицины» (Беларусь) и ОАО «Агрокомбинат «Юбилейный» (Беларусь). Тестирование препарата проводили на чашках Петри методом кратных разбавлений. Каждый микроорганизм тестировали в двух сериях экспериментов, используя культуру, выращенную на двух разных питательных средах [12].

Исследования *in vivo* включали лечение дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных (собак, кошек, кроликов и овец), антисептик применяли один раз в сутки методом аппликаций в течение 5–14 дней.

Изучение противотуберкулезной активности

Проведено на базе ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. Активность *in vitro* оценивали в отношении чувствительного референтного штамма микобактерий туберкулеза (МБТ) *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (Институт гигиены и эпидемиологии, Прага, 1976) и клинического изолята *M. tuberculosis* 5582 с множественной лекарственной устойчивостью (коллекция штаммов МБТ СПб НИИФ). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли с помощью метода REMA [13] на культурах *M. tuberculosis H37Rv* и клинического изолята 5582 с устойчивостью к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и пиразинамиду. За значение МИК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой средний уровень флуоресценции значимо не превышал 1% от уровня в контрольной культуре МБТ, растущей без ингибитора. Рост бактерий регистрировали как визуально по изменению цвета индикатора резазурина (с голубого на розовый), так и с помощью планшетного флуориметра FLUOstarOptima (Германия) при длине волны возбуждения — 520 нм, излучения — 590 нм).

Противотуберкулезную активность *in vivo* исследовали на мышах-самцах линии C57black/6 массой 16–18 г (питомник «Андреевка», Научный центр биомедицинских технологий ФМБА; Россия) [14, 15], используя две модели туберкулеза: при заражении стандартным тест-штаммом *M. tuberculosis H37Rv*, и лекарственно устойчивым штаммом МБТ 5582. Введение лечебных препаратов модельным животным начинали в обеих сериях опытов на четвертый день после заражения. Все препараты вводили внутрижелудочно ежедневно, кроме субботы и воскресения, до окончания эксперимента. Комплекс ХГ-ЭДТА-Zn вводили в двух дозах: 7 мг/кг и 14 мг/кг. В качестве сравнения служил противотуберкулезный препарат моксифлоксацин в средней терапевтической дозе 7 мг/кг. Общее время эксперимента составляло 40 дней.

Изучение вирулицидной активности

Изучение вирулицидной активности проводили на базе «Института вирусологии им. Д. И. Ивановского» в соответствии с Методическими указаниями [16]. Использовали вакцинный штамм вируса полиомиелита (тип 1, титр вируса — 6,5 lgТЦИД$_{50}$; НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова, Россия), аденовирус человека (тип 5, титр вируса — 5,5 lg ТЦИД$_{50}$; Государственная коллекция вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского, Россия). Для работы с вирусом полиомиелита использовали перевиваемую культуру клеток почки зеленых мартышек Vero, для работы с аденовирусом — перевиваемую линию клеток HEp2.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки использовали пакет прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft; США). Метрические показатели представляли в виде среднего и ошибки среднего (M ± *m*). Оценку достоверности различия метрических показателей проводили с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка биоцидной активности

Изучение активности 0,05%-го ХГ-ЭДТА-цинкового комплекса *in vitro* в сравнении с биглюконатом хлоргексидина в той же концентрации проведено на серии культур стандартных микроорганизмов. Результаты оценки площади зоны отсутствия роста культур на чашках Петри представлены в табл. 1.

Результаты *in vitro* оценки антимикробной активности в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц представлены в табл. 2.

В концентрации 1,0–0,008 мг/мл (в зависимости от вида возбудителя) комплекс ХГ-ЭДТА-Zn обладает как бактериостатическим, так и бактерицидным действием в отношении всех исследованных болезнетворных культур.

Результаты исследований *in vivo*, полученные в клинических условиях при лечении дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных, представлены в табл. 3.

Таблица 2. Активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в отношении возбудителей болезней птиц

Вид культуры	Питательная среда	Номер пробы и концентрация активного вещества, мг/мл									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		1,0	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002
E. coli-1	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	–	–	–	–	±	+	+
E. coli-2	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
S. enteritidis	МПБ	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
	Среда Эндо	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+
S. gallinarum	МПБ	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
	Среда Эндо	–	–	–	±	+	+	+	+	+	+
S. typhimurium	МПБ	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
	Среда Эндо	–	–	±	±	±	+	+	+	+	+
P. vulgaris	МПБ	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
	МПА	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
St. aureus	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
	МПА	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+
St. epidermidis	МПБ	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	МПА	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: «–» — полное отсутствие роста; «+» — рост единичных колоний; «+» — обычный рост; МБП — мясопептонный бульон; МПА — мясопептонный агар.

Применение антисептика методом аппликаций в течение 5–14 дней приводило к полному выздоровлению животных. Аллергических реакций или других негативных побочных эффектов при лечении не было отмечено.

Результаты тестирования противотуберкулезной активности *in vitro* в отношении штамма *M. tuberculosis* 5582 представлены на рис. 1.

По результатам тестирования *in vitro* на модели *M. tuberculosis H37Rv*, комплекс ХГ-ЭДТА-Zn обладает выраженной противотуберкулезной активностью: значение МИК составляет 6,2 мкг/мл.

Результаты изучения противотуберкулезной активности *in vivo*. Результаты исследования терапевтической эффективности комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в сравнении с моксифлоксацином представлены в табл. 4, а данные по высеваемости МБТ из легких — в табл. 5.

К окончанию эксперимента на 40-й день от инфицирования в группе контроля (без лечения) летальность составила 70% в случае *M. tuberculosis H37Rv*; и 40% — в случае штамма 5582. При этом на обеих моделях в группе контроля обнаружено резкое увеличение коэффициентов массы легких и селезенки, а также тотальное поражение легочной ткани с участками некроза, в посевах гомогенатов легких регистрировался сплошной рост МБТ.

Лечебный эффект комплекса ХГ-ЭДТА-Zn подтвержден на обеих моделях туберкулеза, при заражении мышей стандартным тест-штаммом *M. tuberculosis H37Rv* и лекарственно устойчивым штаммом МБТ 5582, в сравнении с известным противотуберкулезным препаратом моксифлоксацин в средней терапевтической дозе (7 мг/кг). На обеих моделях туберкулеза комплекс оказывал протективное действие, предотвращая гибель инфицированных мышей (см. табл. 4). На модели лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis H37Rv* препарат достоверно снижал величину всех тестируемых параметров по сравнению с группой контроля. В дозе 14 мг/кг действие препарата было достоверно более выраженным, чем в дозе 7,0 мг/кг, т. е. наблюдаемый эффект был дозозависимым. По снижению

Таблица 3. Активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn в отношении возбудителей болезней птиц

Показатели	Животные	Серозно-катаральный дерматит	Гнойно-катаральный дерматит	Дерматиты паразитарной этиологии (в комплексной терапии)
Число опытных животных	Собаки	14	10	6
	Кошки	7	2	–
	Кролики	–	–	12
	Овцы	–	–	7
Продолжительность лечения, дней	Собаки	5	7–10	6–14
	Кошки	5	10–12	–
	Кролики	–	–	6–9
	Овцы	–	–	6–12
Выздоровело животных	Собаки	11	9	5
	Кошки	7	2	–
	Кролики	–	–	10
	Овцы	–	–	7

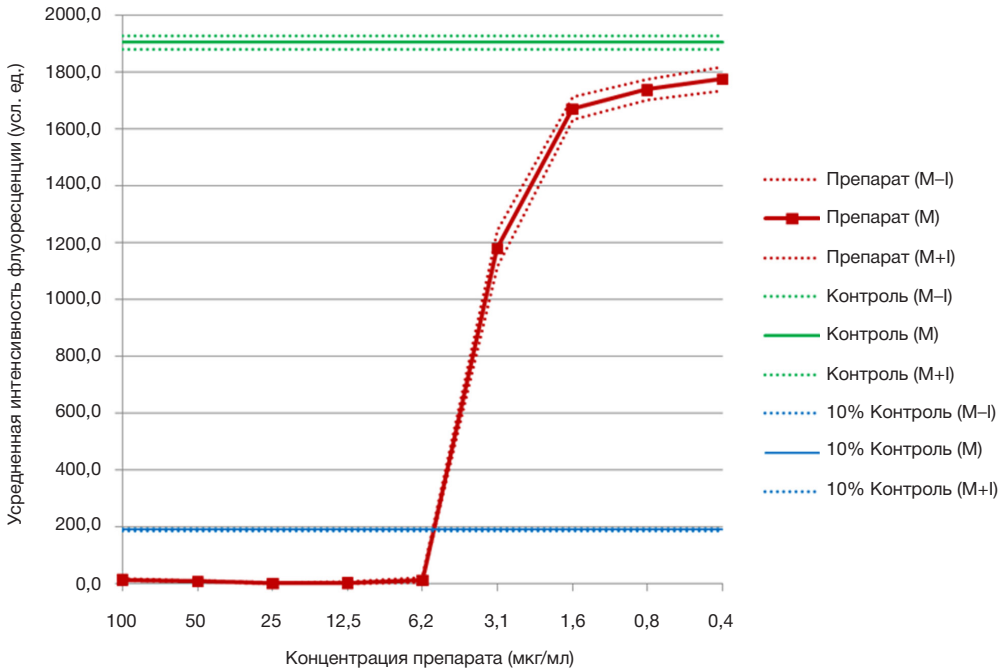

Рис. 1. Изменение интенсивности роста тест-штамма *M. tuberculosis H37Rv* при воздействии комплекса ХГ-ЭДТА-Zn. M — среднее значение, (M-I) и (M+I) — нижняя и верхняя границы доверительного интервала (при $\alpha = 0,05$)

показателей пораженности легких комплекс ХГ-ЭДТА-Zn в дозе 14 мг/кг на обеих моделях туберкулеза был практически так же активен, как моксифлоксацин в дозе 7 мг/кг, а по показателям селезенки он незначительно уступал моксифлоксацину.

Результаты изучения вирулицидной активности. Результаты оценки степени ингибирования репродукции вирусов, выраженные в единицах $ТЦИД_{50}$ (50%-я тканевая цитопатическая инфекционная доза) представлены в табл. 6.

Как в суспензионном тесте (смешение), так и при обработке поверхностей, контаминированных вирусом полиомиелита и аденовирусом человека, раствор комплекса с содержанием хлоргексидина 0,2% в течение 1–5 мин инактивировал данные вирусы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ЭДТА дает прочный комплекс с катионом цинка (константа нестойкости $[Zn\ Edta]^{2+}$ K_n равна $3,2\times10^{-17}$) [11]. Описано также получение комплексного соединения хлоргексидина с ЭДТА [17]. Однако более сложные, трехкомпонентные комплексы, включающие ЭДТА, цинк и хлоргексидин, не изучены. Как мы предположили, в водной среде биглюконат хлоргексидина, динатриевая соль ЭДТА и хлорид цинка могут образовывать комплексное соединение со структурой, представленной на рис. 2. Действительно, в МАЛДИ-масс-спектре был обнаружен сигнал с m/z 859,27, соответствующий протонированной форме MH+ предсказанной структуры. Фрагментный

Таблица 4. Показатели тяжести течения туберкулезной инфекции у мышей при заражении *M. tuberculosis H37Rv* и заражении лекарственно устойчивым штаммом 5582 (через пять недель от начала лечения)

№ группы	Препарат, доза *per os*	Летальность, %	Коэффициенты массы, у. е.		Индекс поражения легких, у. е.
			легких	селезенки	
Модель заражения *M. tuberculosis H37Rv*					
1	Контроль заражения (нелеченные)	70	2,13 ± 0,18	1,89 ± 0,19	3,25 ± 0,11
2	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	0	1,12 ± 0,06 $p_{1-2} < 0,001$	0,83 ± 0,03 $p_{1-2} < 0,002$	2,45 ± 0,03 $p_{1-2} < 0,001$
3	ХГ-ЭДТА-Zn 7,0 мг/кг	0	1,28 ± 0,08 $p_{1-3} < 0,002$	1,05 ± 0,07 $p_{1-3} < 0,002$	2,55 ± 0,08 $p_{1-3} < 0,001$
4	ХГ-ЭДТА-Zn 14 мг/кг	0	1,24 ± 0,09 $p_{1-4} < 0,002$	1,01 ± 0,09 $p_{1-4} < 0,002$	2,52 ± 0,05 $p_{1-4} < 0,001$
Модель заражения штаммом 5582 с множественной лекарственной устойчивостью					
5	Контроль заражения (нелеченные)	40	1,13 ± 0,03	1,05 ± 0,04	2,92 ± 0,04
6	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	0	0,98 ± 0,04 $p_{1-2} < 0,01$	0,69 ± 0,05 $p_{1-2} < 0,001$	2,30 ± 0,08 $p_{1-2} < 0,001$
7	ХГ-ЭДТА-Zn 14,0 мг/кг	0	1,01 ± 0,03 $p_{1-3} < 0,05$	0,91 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,05$, $p_{2-3} < 0,01$	2,48 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} < 0, 05$

Таблица 5. Высеваемость МБТ из легких у мышей, зараженных *M. tuberculosis H37R* и 5582, через пять недель от начала лечения с использованием комплекса ХГ-ЭДТА-Zn

№ группы	Препарат, доза *per os*	Число колоний МБТ в легких, КОЕ × 10^3	Число жизнеспособных микобактерий в легких, lg
Заражение *M. tuberculosis H37Rv*			
1	Контроль заражения (нелеченные)	129,6 ± 4,3	5,11 ± 0,01
2	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	24,6 ± 4,6 $p_{1-2} < 0,001$	4,36 ± 0,09 $p_{1-2} < 0,001$
3	ХГ-ЭДТА-Zn 7,0 мг/кг	41,99 ± 5,54 $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,05$	4,61 ± 0,05 $p_{1-3} < 0,001$, $p_{2-3} < 0,05$
4	ХГ-ЭДТА-Zn 14 мг/кг	35,40 ± 3,19 $p_{1-4} < 0,001$	4,54 ± 0,05 $p_{1-4} < 0,001$
Заражение штаммом 5582 с множественной лекарственной устойчивостью			
6	Контроль заражения (нелеченные)	18,39 ± 1,60	4,26 ± 0,04
7	Моксифлоксацин 7,0 мг/кг	9,04 ± 1,57 $p_{1-2} < 0,01$	3,93 ± 0,07 $p_{1-2} < 0,01$
8	ХГ-ЭДТА-Zn 14,0 мг/кг	11,48 ± 1,58 $p_{1-3} < 0,02$	4,04 ± 0,06 $p_{1-3} < 0,02$

масс-спектр данного иона содержал сигналы с m/z 567,2 (ион протонированного аддукта хлоргексидина и цинка), m/z 505,3 (ион протонированного хлоргексидина) и m/z 353,3 (ион протонированного комплекса ЭДТА-Zn), что однозначно доказывало его структуру. В структуре данного комплекса, очевидно, содержится центральный четырехкоординированный двухзарядный катион цинка, двухзарядный катион хлоргексидиния и четырехзарядный анион полностью депротонированной молекулы ЭДТА. Следует отметить достаточно высокую стабильность тройного комплекса, о чем свидетельствует тот факт, что он сохраняется в жестких условиях испарения под действием лазера.

Стабильность тройного комплекса ХГ-ЭДТА-Zn можно объяснить внутримолекулярным солеобразованием, в результате чего катионные и анионные фрагменты в данной системе стехиометрически уравновешивают друг друга, образуя в сумме электронейтральную молекулу.

Включение хлоргексидина в состав прочного тройного комплекса с участием ЭДТА и цинка сопровождается повышением биоцидной активности (см. табл. 1). В отношении исследованных бактериальных и грибных штаммов комплекс ХГ-ЭДТА-Zn в 4–5 раз более активен, чем биглюконат хлоргексидина.

Комплекс хлоргексидина демонстрирует также высокую эффективность *in vitro* в отношении основных возбудителей бактериальных болезней птиц (см. табл. 2), а также *in vivo* в клинических условиях при лечении дерматитов у домашних и сельскохозяйственных животных — собак, кошек, кроликов и овец (см. табл. 3). Можно заключить, что комплекс ХГ-ЭДТА-Zn может быть эффективным средством для лечения бактериальных и грибковых заболеваний кожи различной этиологии, для заживления царапин, трещин, ожогов, инфицированных ран, пиодермии.

Как показывают наши исследования, комплекс ХГ-ЭДТА-Zn проявляет заметную противотуберкулезную активность, что весьма неожиданно, поскольку хлоргексидин сам по себе обладает очень слабым воздействием на микобактерии туберкулеза (МБТ). В экспериментах *in vitro* активность (МИК) комплекса по сравнению со стандартным штаммом *M. tuberculosis H37Rv* (см. рис. 1) составляет 6,2 мкг/мл, а по сравнению с лекарственно устойчивым штаммом МБТ 5582 активность в 2 раза выше (МИК 3,1 мкг/мл), т. е. активность по сравнению с лекарственно устойчивым штаммом в 2 раза выше, чем в случае с стандартным туберкулезным штаммом.

Еще более неожиданно наличие у комплекса ХГ-ЭДТА-Zn противотуберкулезного действия *in vivo* — в условиях перорального введения на мышах, хотя известно, что хлоргексидин в свободном виде практически не всасывается из ЖКТ. Достоверность лечебного эффекта препарата подтверждается на двух моделях туберкулеза — на основании данных по выживаемости животных, по результатам оценки физиологических показателей (см. табл. 4) и данных по высеваемости МБТ из легких (см. табл. 5). На модели лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis H37Rv* комплекс ХГ-ЭДТА-Zn уступает моксифлоксацину, а на модели лекарственно устойчивого штамма его эффект практически равен моксифлоксацину.

Полученные результаты позволяют рассматривать комплекс ХГ-ЭДТА-Zn не только как средство дезинфекции,

Таблица 6. Вирулицидная активность комплекса ХГ-ЭДТА-Zn

Объект	Способ обработки	Время обработки, мин	Снижение репродукции вируса, lg $ТЦИД_{50}$	
			Полиомиелит	Аденовирус
Вирусная суспензия	Смешение 1 : 9	5	3,5	4,0
Искусственная кожа	Протирка	1	4,0	4,0
		2 × 1,5	5,0	4,5
Латекс	Протирка	3	4,0	4,0
Металл	Протирка	5	4,7	4,5
Стекло	Протирка	5	5,0	4,3
Пластик	Протирка	5	4,3	4,3

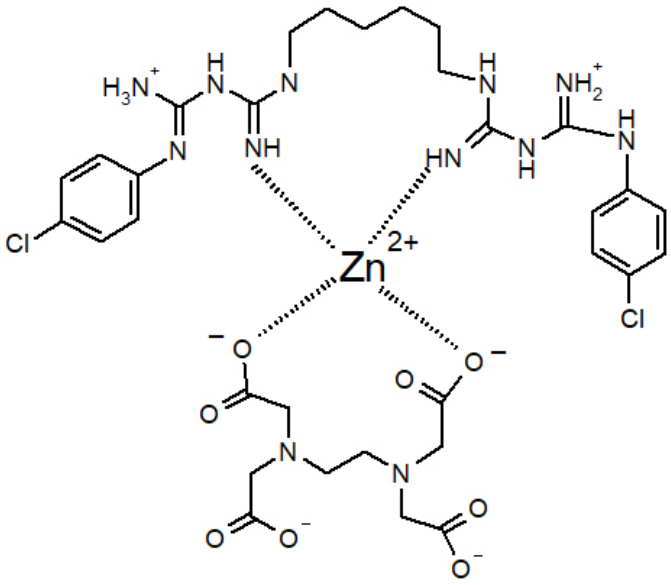

Рис. 2. Структурная формула ХГ-ЭДТА-Zn комплекса

но и как потенциальный противотуберкулезный препарат, который может быть использован в качестве вспомогательного средства при лечении лекарственно устойчивых форм туберкулеза.

Помимо бактерий, биоцидный эффект комплекса ХГ-ЭДТА-Zn распространяется и на вирусы (см. табл. 6). Полученные результаты свидетельствуют, что комплекс ХГ-ЭДТА-Zn может быть использован для дезинфекции объектов, контаминированных данными вирусами.

ВЫВОДЫ

Трехкомпонентный комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn обладает выраженным биоцидным эффектом в отношении болезнетворных бактерий, грибов, микобактерий туберкулеза и вирусов, причем по уровню биоцидной активности и широте спектра действия он значительно превосходит хлоргексидин. В целом, комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn представляется перспективным дезинфицирующим средством, которое может быть использовано для борьбы с распространением опасных бактериальных и вирусных инфекций. На моделях экспериментального туберкулеза при системном введении комплекс хлоргексидин-ЭДТА-Zn проявляет лечебный эффект, сопоставимый с моксифлоксацином. Это позволяет рекомендовать данный комплекс для дальнейшего изучения в качестве возможного средства лечения лекарственно устойчивых форм туберкулеза.

Литература

1. Квашнина Д. В., Ковалишена О. В. Оценка применения хлоргексидина как антисептического средства. Медицинский альманах. 2016; 43 (3): 62–66.
2. Зверьков А. В., Зузова А. П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. Антимикробные препараты. 2013; 15 (4): 279–85.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 2005; 99: 703–15.
4. Hugo WB. Disinfection mechanisms. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell, 1992; p. 187–210.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2006.
6. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol. 1997; 15: 55–62.
7. Junco-Lafuente MP, Baca-García P, Mesa-Aguado FL. 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.
8. Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, Bourgeois D. 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 (4): 1126.
9. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. 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 (1): 1162–16.
10. Gupta M, Mahajan V, Mehta K, Chauhan P. Zinc Therapy in dermatology: a review. Dermatology Research and Practice. 2014; 9. Available from: https://www.hindawi.com/journals/drp/2014/709152/.
11. Дятлова Н. М., Темкина В. Я., Попов К. И. Комплексоны и комплексонаты металлов. М.: Химия, 1988; 544 с.
12. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010; 615 с.
13. Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. ResazurinMicrotitre Assay Plate — Simple and Inexpensive method for Detection of Dgug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemotherap. 2002; 46 8: 2720–2.
14. Александрова А. Е., Ариэль Б. М., Оценка тяжести туберкулезного процесса в легких мышей. Проблемы туберкулеза. 1993; 3: 52–53.
15. Franzblau SG, DeGroote MA, Cho SH, Andries K, Nuermberger E, Ormel M, et al. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2012; 92: 453–88.
16. Методические указания по изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств. Руководство. МУ

3.5.2431-08. M., 2010.
17. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Barry L. Musikant BI, Deutsch AS. Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. JOE. 2008; 34 (12): 1521–3.

References

1. Kvashnina DV, Kovalishena OV. Ocenka primenenija hlorgeksidina kak antisepticheskogo sredstva. Medicinskij al'manah. 2016; 43 (3): 62–66. Russian.
2. Zverkov AV, Zuzova AP. Hlorgeksidin: proshloe, nastojashhee i budushhee odnogo iz osnovnyh antiseptikov. Antimikrobnye preparaty. 2013; 15 (4): 279–85. Russian.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 2005; 99: 703–15.
4. Hugo WB. Disinfection mechanisms. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford: Blackwell, 1992; p. 187–210.
5. Mashkovskij MD. Lekarstvennye sredstva. M.: Novaja Volna, 2006. Russian.
6. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontol. 1997; 15: 55–62.
7. Junco-Lafuente MP, Baca-García P, Mesa-Aguado FL. 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.
8. Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, Bourgeois D. 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 (4): 1126.
9. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. 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 (1): 1162–16.
10. Gupta M, Mahajan V, Mehta K, Chauhan P. Zinc Therapy in dermatology: a review. Dermatology Research and Practice. 2014; 9. Available from: https://www.hindawi.com/journals/drp/2014/709152/.
11. Djatlova NM, Temkina VYa, Popov KI. Kompleksony i kompleksonaty metallov. M.: Himija, 1988; 544 s. Russian.
12. Metody laboratornyh issledovanij i ispytanij mediko-profilakticheskih dezinfekcionnyh sredstv dlja ocenki ih jeffektivnosti i bezopasnosti: Rukovodstvo. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2010; 615 s. Russian.
13. Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. ResazurinMicrotitre Assay Plate — Simple and Inexpensive method for Detection of Dgug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemotherap. 2002; 46 8: 2720–2.
14. Aleksandrova AE, Arijel BM, Ocenka tjazhesti tuberkuleznogo processa v legkih myshej. Problemy tuberkuleza. 1993; 3: 52–53. Russian.
15. Franzblau SG, DeGroote MA, Cho SH, Andries K, Nuermberger E, Ormel M, et al. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2012; 92: 453–88.
16. Metodicheskie ukazanija po izucheniju i ocenke virulicidnoj aktivnosti dezinficirujushhih sredstv. Rukovodstvo. MU 3.5.2431-08. M., 2010. Russian.
17. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Barry L. Musikant BI, Deutsch AS. Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. JOE. 2008; 34 (12): 1521–3.