DOI: 10.26693/jmbs02.05.132
УДК 691.175.5/.8:615.28:[579.61+519.6:531.3]

Кондратюк В. М., Ковальчук В. П., Бектимірова Р. М., Фомін О. О.

ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ ВИДІЛЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ РЕЧОВИНИ З ПОЛІМЕРНИХ КОМПОЗИЦІЙ МІКРОБІОЛОГІЧНИМ МЕТОДОМ В ПОЄДНАННІ З МАТЕМАТИЧНИМ АНАЛІЗОМ

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова

kondratuk2007@gmail.com

Для проведення скринінгу комбінацій нових полімерів та протимікробних засобів пропонується комбінувати бактеріологічний метод з математичним аналізом. Запропонований метод застосували для вивчення кінетики виділення декаметоксину з семи різних полімерних композицій на основі поліметилметакрілату або цинк-фосфатного цементу. Кінетику виділення декаметоксину з антисептичних бусин вивчали в умовах відмивання взірців ізотонічним розчином хлориду натрію методом «колодязів». Математичний аналіз провели за допомогою Excel Microsoft Office. З використанням такого методу кінетика виділення протимікробної речовини з полімерних композицій описується у вигляді математичних рівнянь, що дає змогу прогнозувати тривалість протимікробної ефективності та визначати кількість виділеної речовини. Отримані рівняння та графіки екскреції відображають закономірності, які залежать від фізико-хімічних властивостей складових речовин у полімерних композиціях.

Ключові слова: полімерна протимікробна композиція, фармакокінетика, декаметоксин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Вивчення багатовекторності властивостей лікарського антимікробного препарату декаметоксину® та його лікарських форм», № держ. реєстрації 0115U006000.

Вступ. Полімерні антимікробні композиції використовуються у сучасній медицині для попередження інфікування виробів медичного призначення, в якості систем локальної доставки протимікробних речовин, з лікувальною метою. Зокрема місцеве використання поліметилметакрілатних (ПММА) композицій насичених антибіотиками покращує результати лікування відкритих переломів [1]. Антимікробні речовини, що використовують в системах локальної доставки, які ще недавно ефективно впливали на збудників ранової інфекції, швидко втрачають свою ефективність, завдяки розповсюдженню полірезистентних мікроорганізмів [2]. Зростання кількості інфекційних ускладнень та важкість їх лікування підштовхує до розробки нових композицій з протимікробними властивостями. В якості матричного матеріалу для таких композицій використовуюсть різноманітні за своїми фізико-хімічними властивостями сполуки, такі як кістковий цемент (поліметилметакрилат), сульфат або фосфат кальцію, гідроксилапатит, ряд синтетичних медичних полімерів. На ці матеріали адсорбують широкий перелік протимікробних речовин, що мають різну здатність до розчинення у матриці та біологічних рідинах [3].

На етапі доклінічного дослідження таких композицій постає питання визначення закономірностей виділення протимікробних речовин у оточуюче середовище. Існує ряд фотохімічних методів, які дозволяють встановили концентрацію речовин у елюаті, проте вони малодоступні та потребують додаткової кваліфікації. В нашому дослідженні для вивчення цього процесу ми використали мікробіологічний метод «колодязів» поєднавши його з математичним аналізом за допомогою Excel Microsoft Office. Такий спосіб дозволяє в числовому виразі описувати фармакокінетичні властивості нових сполук та проводити їх статистичне порівняння.

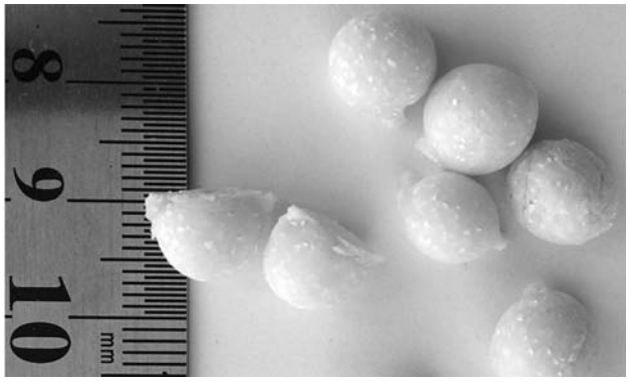

Рис. 1. Півсфери – бусини з поліметилметакрилату, біоситалу Синтекість БКС 11 та декаметоксину

Мета дослідження: розробити методику визначення кінетики виділення протимікробної діючої речовини з полімерної композиції з використанням мікробіологічних методів та математичного аналізу для оцінки ефективності сучасних засобів імплантаційної антисептики.

Об'єкт і методи дослідження. Було виготовлено 7 зразків полімерної антимікробної композиції з різним якісним складом. Композиції № I, II, III, IV, V являли собою суміш поліметилметакрилату (ПММА), біокомпозиту Синтекість (варіант БКС 11) та декаметоксину у різному співвідношенні. Основу композицій VI та VII становив цинк-фосфатний цемент (ЦФЦ), що використовується у якості пломбувального матеріалу у стоматології.

Кожна зі створених композицій відрізнялась за концентрацією антисептика декаметоксину, ступенем адсорбуючої здатності матричної основи та її здатністю до біодеградації у воді. Ці фактори є основними що впливають на виділення речовин з полімерних систем локальної доставки препаратів [4, 5]. Після змішування сухих компонентів сумішей до них додавали полімеризатор, а після затвердіння отримували зразки у вигляді однакових півсфер - бусин. Ці антисептичні бусини використовували у якості зразків для подальших експериментів (**рис. 1**).

Кінетику виділення декаметоксину з антисептичних бусин вивчали в умовах відмивання взірців ізотонічним розчином хлориду натрію методом «колодязів». Для цього антисептичні бусини інкубували у 1 мл ізотонічного розчину, в який виділявся декаметоксин з бусин і утворювався елюат. Метод «колодязів» заснований на дифузії досліджуваних препаратів в агаризоване поживне середовище. В чашки Петрі наливали 10 мл стерильного МПА. Після застигання шару на нього поміщали стерильні циліндри з нержавіючої сталі (висота 10 мм, внутрішній діаметр 6 мм) і заливали їх розплавленим інфікованим агаром об'ємом 15 мл. Інфікування агару проводили суспензією добової культури S. aureus 209 з розрахунку 500 тис. мікробних тіл на 1 мл. Після застигання другого шару агару циліндри виймали, до лунок, що утворилися, вносили по 0,05 мл елюату. Елюат відбирали через 2, 8, 12, 24, 48, 72, 96 годин перебування антисептичних бусин у ізотонічному розчині. Для визначення швидкості елюції декаметоксину з антисептичних бусин після відбору 0,05 мл елюату, проводили заміну ізотонічного розчину (**рис. 2**).

В одній чашці Петрі випробовували активність експериментальних зразків і контролю. Антимікробну активність кожного зразка вивчали у трикратному повторенні дослідів за зоною затримки росту навколо «колодязя». Зона затримки росту напряму залежить від концентрації декаметоксину у внесеному розчині або елюаті. В якості контролю використовували розведення декаметоксину з відомою концентрацією.

Результати досліджень та їх обговорення. За зонами затримки росту навколо контрольних

Рис. 2. Антибактеріальна активність елюату з полімерних композицій у першу (I), другу (II) та третю (III) добу відмивання. Метод «колодязів». (10, 20, 50, 100, 200 – концентрація декаметоксину (мкг/мл) у контрольних лунках для побудови калібровочної кривої. II, III, IV, V, VI – надписи коло лунок відповідають номерам полімерних композицій

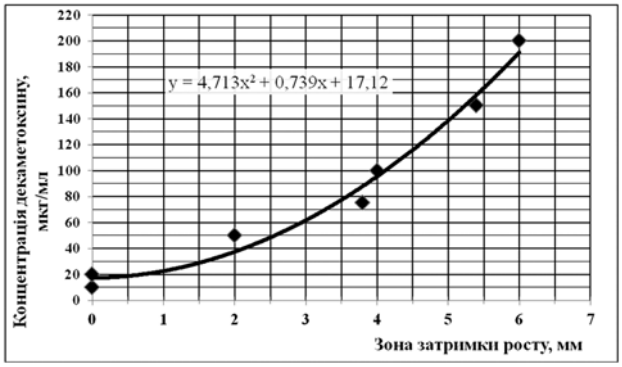

Рис. 3. Шкала перерахунку для визначення концентрації декаметоксину у елюаті. Достовірність апроксимації – R2 = 0,98; p = 0,0009

лунок, в які вносили розчин декаметоксину у відомих концентраціях, побудовано калібровочну шкалу та формулу перерахунку (**рис. 3**).

Поєднання мікробіологічного методу «колодязів» та математичного аналізу дуже детально описує та ілюструє зміни у процесі виділення антисептичної речовини із створених композицій. Отримана формула дозволяє визначати концентрації декаметоксину, що міститься у кожному зразку елюату на різних етапах досліду, прогнозувати зміни та передбачати кількість протимікробної речовини, що буде виділена через певний час. Так, встановлено, що найбільша кількість декаметоксину, виділяється у першу добу (**рис. 4**). Розрахунки та графіки віддзеркалюють як на кількість виділеного декаметоксину впливає його концентрація у полімерній композиції та матеріал матричної основи.

Такий метод дає змогу описати кінетику вивільнення декаметоксину з бусин поліноміальним рівнянням, розрахованим за допомогою Excel Microsoft Office. Наприклад для взірців, виготовлених з композиції № V воно має такий вигляд:

[Концентрація декаметоксину] =
$= 19{,}35x^3 - 187{,}2\,x^3 + 527{,}7\,x - 355{,}1$

де *x* – кількість діб, протягом яких відбувалось вивільнення декаметоксину з антисептичних бусин (**рис. 5**).

Важливим у процесі створення композицій з антимікробними властивостями є отримання таких матеріалів, які тривало та рівномірно виділяли б у оточуюче середовище антисептичну речовину в концентраціях, достатніх для створення місцевого антисептичного режиму [6]. Різноманіття сучасних полімерів та хіміопрепаратів робить майже неосяжною кількість їх комбінацій. Дуже важливо на етапі лабораторного аналізу мати метод, який би дозволив провести скринінг та обрати найбільш перспективні сполуки для вивчення на тваринах та в клініці. Саме залучення можливостей комп'ютерних програм дають змогу наочно проілюструвати та описати такі процеси, полегшити їх сприйняття.

Висновок. Наведені вище рівняння та графіки екскреції діючої речовини у рідку фазу відображають закономірності, обумовлені фізико-хімічними властивостями складових полімерної композиції. З використанням описаного методу кінетика виділення протимікробної речовини з полімерних композицій описується у вигляді математичних рівнянь, що дає змогу визначати концентрацію виділеної речовини в локусі розташування полімерної частки та прогнозувати тривалість підтримки антисептичного режиму у тканинах.

Перспективи подальших досліджень. Використання даного методу дозволить за короткий термін провести скринінг полімерних композицій, матричною основою яких є полімерні матеріали різних хімічних груп, визначити, за якими закономірностями вивільнюються хіміотерапевтичні препарати, що відрізняються за протимікробним спектром, як ці процеси відбуваються при застосуванні їх комбінацій.

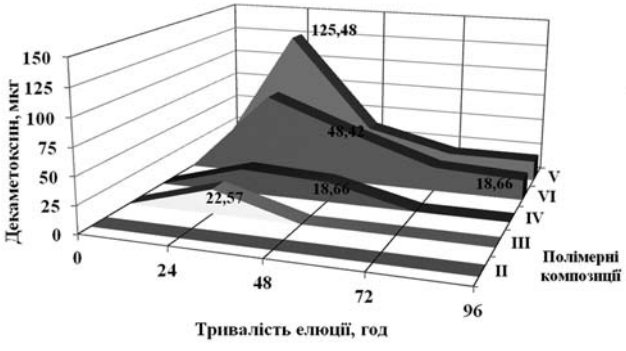

Рис. 4. Щодобова екскреція декаметоксину в умовах вимивання декаметоксину з композицій №№ III, IV, та VI, на основі Починаючи з другої доби зниження концентрації препарату відбувалось за моноекспоненціальним законом (Коефіцієнт апроксимації R2 – 0,92)

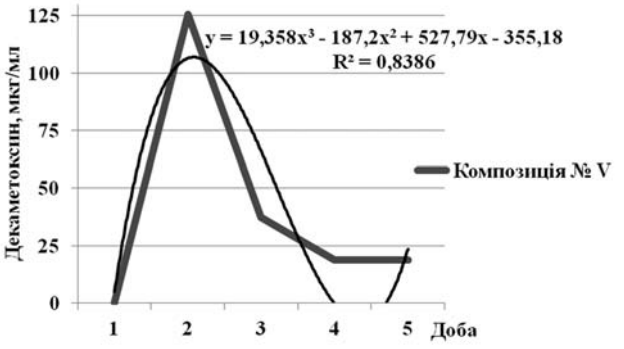

Рис. 5. Моделювання екскреції декаметоксину з композиції № V в умовах вимивання. Коефіцієнт апроксимації рівняння R2 = 0,84

References

1. Ostermann PA., Seligson D., Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone Joint Surg Br*. 1995; 77: 93–7. PMID: 7822405.
2. Wallum TE, Yun HE, Rini EA, Carter K, Guymon CH, Akers KS, Tyner SD, White CE, Murray CK. Pathogens present in acute mangled extremities from afghanistan and subsequent pathogen recovery. *Mil Med*. 2015; 180 (1): 97–103. PMID: 25562864. DOI: 10.7205/MILMED-D-14-00301.
3. Privolnev VV, Rodin AV, Karakulina EV. Mestnoe primenenie antibiotikovv lechenii infektsiy kostnoy tkani. *Klin mikrobiol antimikrob khimioter*. 2012; 14 (2): 118–31.
4. Keng-Shiang Huang, Chih-Hui Yang, Shu-Ling Huang, Cheng-You Chen, Yuan-Yi Lu, Yung-Sheng Lin, Antonella Piozzi, Iolanda Francolini. Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep; 17 (9): 1578. doi: 10.3390/ijms17091578 PMCID: PMC5037843.
5. Martha Merchan, Jana Sedlarikova, Vladimir Sedlarik, Michal Machovsky, Jitka Svobodova, Petr Saha. Antibacterial polyvinyl chloride/antibiotic films: The effect of solvent on morphology, antibacterial activity, and release kinetics. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010; 118: 2369–78. DOI: 10.1002/app.32185.
6. Yan Xue, Huining Xiao, Yi Zhang. Antimicrobial Polymeric Materials with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 3626-55. doi:10.3390/ijms16023626.

УДК 691.175.5/.8:615.28:[579.61+519.6:531.3]

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В СОЧЕТАНИИ С МАТЕМАТИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ

Кондратюк В. Н., Ковальчук В. П., Бектимирова Р. М., Фомин А. А.

Резюме. Для проведения скрининга комбинаций новых полимеров и противомикробных средств предлагается комбинировать бактериологический метод с математическим анализом. Предложенный метод применили для изучения кинетики выделения декаметоксина из семи различных полимерных композиций на основе полиметилметакрилата или цинк-фосфатного цемента. Кинетику выделения декаметоксина из антисептических бусин изучали в условиях отмывания образцов физиологическим раствором методом «колодцев». Математический анализ провели с помощью Excel Microsoft Office. С использованием такого метода кинетика выделения противомикробного вещества из полимерных композиций описывается в виде математических уравнений, позволяет прогнозировать продолжительность противомикробной эффективности и определять количество выделенного вещества. Полученные уравнения и графики экскреции отражают закономерности, которые зависят от физико-химических свойств составляющих веществ в полимерных композициях.

Ключевые слова: полимерная противомикробная композиция, фармакокинетика, декаметоксин.

UDC 691.175.5/.8:615.28:[579.61+519.6:531.3]

Examination of the Kinetics of Antimicrobial Substance Release from Polymer Compounds by Using Microbiological Method in Conjunction with Mathematical Analysis

Kondratyuk V., Kovalchuk V., Bektimirova R., Fomin O.

Abstract. Antimicrobial agents that have recently been effective in the wound infections treatment are rapidly losing their effectiveness due to the development of microorganisms' resistance. New polymeric materials constantly appear, promising the creation of systems for the local delivery of chemotherapeutic agents. At the stage of such compounds' preclinical study, the question on the determination of patterns of antimicrobial release in the environment arises. Within current study, the microbiological "wells" method was used to examine antimicrobial excretion, accompanied with mathematical analysis using Microsoft Excel. The pharmacokinetic properties of new compounds can be numerically described and statistically compared by means of this method.

Materials and methods. Seven samples of a polymer antimicrobial compounds were made, which presented a mixture of polymethyl methacrylate (PMMA) or zinc phosphate cement, biocomposite Synthe-Bone and decamethoxin in different ratios.

Each of the created compounds was distinguished by the main factors influencing the substances' release from the polymeric systems of local drugs delivery, like: decamethoxin concentration, the adsorption capacity of the matrix base and its biodegradability in water.

Microbiological method of "wells" accompanied with mathematical analysis conducted by means of Microsoft Excel was used to describe the antimicrobial excretion.

Results. The antimicrobial activity of each sample was studied in triplicate repetition by the inhibition zone around the "well", which is directly dependent on the decamethoxin concentration in the solution. By inhibition zones around the control wells, where decametoxin solution was put at known concentrations, a calibration scale and a conversion formula were constructed. This formula allows us numerically describe the pharmacokinetic properties of new compounds and carry out their statistical comparison. The kinetics of decamethoxin release from certain samples has been described by a polynominal equation that allows to predict the duration of the antibacterial effect of the compounds and to calculate the amount of the drug released at established intervals.

Conclusions. Using this method, the kinetics of antimicrobial substance release is described through mathematical equations, which allows predicting the duration of antimicrobial efficacy and determining the amount of the released substance. The equations and graphs of decamethoxin excretion reflect patterns that depend on the physico-chemical properties of the constituents in the polymer compounds.

Keywords: polymer antimicrobial compounds, pharmacokinetics, decamethoxin.

Стаття надійшла 19.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування