

Винахід стосується фармацевтичних композицій, що мають антимікробну дію, які містять асоціати (комплекси) гіалуронової кислоти, а також способу їх отримання.

Крім того, винахід стосується використання цих асоціатів (комплексів) гіалуронової кислоти для отримання фармацевтичних композицій з антимікробною дією і способу лікування клінічних картин, викликаних мікроорганізмами.

На сьогодні знайдено, що асоціати (комплекси) гіалуронової кислоти, наприклад, гіалуронати цинку і кобальту, виявляють протимікробну дію, і зокрема вони мають гарні протибактеріальні і фунгіцидні ефекти проти аеробних та анаеробних мікроорганізмів.

Асоціати депротонованої гіалуронової кислоти з 3-ма іонами металів 4-ого періоду Періодичної системи, такі як гіалуронати цинку і кобальту, що мають лікувальні ефекти зокрема при стеговій і декубітальній виразці та інших подібних захворюваннях, обговорені в описі угорського патенту №203372.

Макромолекула, відома як гіалуронова кислота, яка звичайно зустрічається у формі натрієвої солі, є сполукою, відомою понад 50 років. Вперше вона була описана Меєром [Meyer et al. J. Biol. Chem. 107, 629 (1934); J. Biol. Chem. 114, 689 (1939)]. Меєр виділив гіалуронову кислоту в кислих умовах. Однак карбоксильні групи дисоціюють при фізіологічних значеннях pH, і назва полісахариду є гіалуронат натрію, якщо катіоном оточення є натрій. Визначення структури було зроблено Weissman et al. [J. Am. Chem. Soc. 76, 1753 (1954)]. Визначити катіон оточення не завжди просто, тому, як запропоновано Balazs (The Biology of Hyaluronan 1989, John Wiley and Sons, Ciba Foundation symposium, p.143), загальною назвою полісахариду (і гіалуронової кислоти і гіалуронату натрію) є гіалуронан.

Гіалуронова кислота є природним глюкозаміногліканом з високою в'язкістю, що містить змінні β 1-4 глюкозамінні залишки; молекулярна вага становить від 50000 до декількох мільйонів. Гіалуронова кислота знайдена у сполучних тканинах усіх ссавців: вона зустрічається в більш високій концентрації в шкірі, склоподібному тілі ока, синовіальній рідині, пуповині, а також у хрящовій тканині. Виділення гіалуронової кислоти є давньою задачею, розділення і використання ультрарешістої гіалуронової кислоти описано, наприклад, у патентах США №4 141 973 та 4 303 676 і в європейському патенті №0 144 019.

В літературі можна знайти велику кількість посилань, що стосуються зв'язку гіалуронової кислоти з загоєнням ран. Згідно з Toole and Gross [B.P.Toole and Gross: "The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation", Dev. Biol. 25, 55-57 (1971)], гіалуронова кислота як головний елемент позаклітинного матриксу відповідає за переміщення клітин різних типів. Вищезгадані автори стверджували, базуючись на експериментальних дослідженнях, що під час загоєння ран збільшується локальна концентрація гіалуронової кислоти, за допомогою чого стимулюються клітинні реакції, необхідні для регенерації тканини. На додаток до вищезгаданого, інші експериментальні результати також підтверджують, що гіалуронова кислота регулює фізіологічні клітинні процеси загоєння ран, забезпечуючи оптимальні умови для міграції і проліферації всіх клітин, що беруть участь у регенерації тканини.

До останніх років, гіалуронову кислоту використовували у формі натрієвої солі в терапії - головним чином, в офтальмології, дерматології, хірургії, суглобній терапії - і косметичі. Солі гіалуронової кислоти, утворені з іонами лужних і лужноземельних металів, магнію, алюмінію, амонію і заміщеного амонію можуть служити носіями для поліпшення поглинання ліків (див бельгійський патент №904547) Солі гіалуронової кислоти з важкими металами, серед них сіль срібла, використовуються як фунгіциди, а сіль золота використовується для лікування артриту (див патент №WO 87/05517) Однак, були виявлені сильні побічні ефекти сполук срібла і золота, а саме їхні впливи на імунну систему, кровотворні органи і нервову систему [M Shinogi, S Maeizumi "Effect preinduction of metallothionein on tissue distribution of silver and hepatic lipid peroxidation", Biol. Pharm Bull (Japan) 16, 372-374 (1993), C Masson et al. Rev Med Interne (France) 13, 225-232 (1992)]

Ми несподівано винайшли, що асоціати гіалуронової кислоти, наприклад, гіалуронати цинку і кобальту, що є корисними для прискорення епітелізації поверхонь тіла з нестачею епітелію, для загоєння стегової, а також декубітальної виразки, мають суттєву антимікробну, зокрема антибактеріальну і фунгіцидну дію; крім того, щодо антибактеріальної активності, виявилось, що вони також діють проти бактерій *Helicobacter pylori*, які, як вважають знедавна, є відповідальними за розвиток шлункових і дуоденальних виразок.

Антибактеріальні ефекти асоціатів гіалуронової кислоти вважаються несподіваними, оскільки можна припустити, що ефекти стимулювання епітелізації та загоєння ран відомих зараз асоціатів гіалуронової кислоти засновані на вищезгаданій тіло-формуючій поведінці гіалуронової кислоти під час загоєння ран, але антимікробна дія асоціатів гіалуронової кислоти не може бути пояснена таким чином.

Відповідно до наших досліджень, цинкові та кобальтові комплекси гіалуронової кислоти виявилися дуже активними як проти аеробних, так і проти анаеробних бактерій, таких як *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, *E coli* та *Helicobacter pylori*.

Зважаючи на те, що *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* - два типи бактерій, що беруть участь у розвитку очних інфекцій, дуже важливим є той факт, що гіалуронатні комплекси є ефективними проти обох цих мікроорганізмів, і використання комплексів гіалуронової кислоти в офтальмології здається особливо перспективним.

Відомо, що гіалуронат натрію використовується внутрішньоочно в офтальмології. Починаючи з 1980 він широко використовується у випадках хірургічного лікування катаракти, імплантації штучних кришталіків, кератопластики. При введенні у передню камеру ока, він інгібує її колапс під час операції і захищає чутливі тканини і клітини. Після хірургічного втручання, гіалуронат натрію вимивають з ока, щоб уникнути збільшення очного тиску, що трапляється в деяких випадках.

Гіалуронат натрію використовується також при лікуванні синдрому "сухого ока" [F.M. Polack et al: "The treatment of dry eye with Na-hyaluronate" *Cornea*, 133-136(1982)].

Місцеве антибактеріальне лікування очних інфекцій - інша важлива область використання комплексів згідно даного винаходу.

Завдяки своїй антибактеріальній дії, гіалуронатні комплекси цинку і кобальту виявилися особливо корисними в офтальмологічній терапії; головним чином гіалуронат цинку здається особливо перспективним в

цій області. На додаток до змашувального ефекту, гіалуронат цинку можна корисно застосовувати як місцевий антибактеріальний засіб в офтальмології; але завдяки його антибактеріальній дії, його також можна використовувати в хірургії ока як заміну гіалуронату натрію, який широко використовується внутрішньоочно починаючи з 1980, для подолання легких запальних реакцій, що виникають [K.L. Goa et al: "Hyaluronic Acid, a Review of its Pharmacology and Use", Drugs 47, 536-566 (1994)], і гіалуронату кобальту відповідно до опису угорського винаходу №203372, тоді як розчини гіалуронату натрію слугували як контрольними розчинами.

Наступний приклад 1 описує отримання 0,5% розчину гіалуронату цинку. Якщо не зазначено інше, надалі відсотки завжди позначають відношення вага/об'єм.

Розчини з концентрацією 0,1 або 0,2%, відповідно, були отримані шляхом розведення 0,5% розчину гіалуронату цинку дистильованою водою якості згідно з прикладом.

Приклад 1

Отримання 100мл 0,5% розчину гіалуронату цинку

Характеристики гіалуронату натрію, що використовували для отримання розчину:

Молекулярна вага: 1 000 000 дальтон

Вміст білка: 0,045%

УФ поглинання:

1 %

A : 0,085

257 nm

1 %

A : 0,050

280 nm

В'язкість:

C → 0

η = 17,25dl/g

25°C

Вміст гіалуронової кислоти: 99,3%

Всі дії, описані нижче, проведені за стерильних умов. Після зважування 0,50г гіалуронату натрію у 100мл колбі, додали 12,50мл розчину хлориду цинку концентрації 0,10моль/літр, приготованого на двічі зменшення ризику зараження протягом операції. Роль цинку як суттєвого мікроелементу в оку була визнана давно [D.A. Newsome, R.J. Rothman; "Zinc uptake in vitro by human retinal pigment epithelium", Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28, 795-799 (1987)]. Особлива перевага гіалуронату цинку полягає в тому, що його використання дозволяє уникати втрати цинку, що може зустрічатися під час операцій на оку. А саме, гіалуронова кислота як поліаніон може видаляти катіони при промиванні після операції. Не можна виключати, що цинк, який також зв'язується через координаційні зв'язки з гіалуронатом, може втрачатися з ока. Це явище можна усунути, використовуючи гіалуронат цинку.

Відомо, що бактеріальне зараження ока - серйозна медична проблема. Найбільш часта інфекція - група *Staphylococcus*. Менш часто зустрічається зараження *Pseudomonas aeruginosa*, що є також дуже небезпечним для ока. Інфікування ока цими бактеріями може призвести до повної сліпоти протягом періоду від 24 до 48 годин. Інфікування ока часто викликаються зараженими офтальмологічними розчинами (очні краплі, розчини для збереження контактних лінз, тощо). Такі заражені офтальмологічні розчини зустрічаються в консультативних кабінетах, клініках і дуже часто в домашньому використанні. Забруднюючі мікроби найчастіше належать до групи *Staphylococcus*; проте *Pseudomonas aeruginosa*, що зустрічаються не так часто але є більш небезпечними, також здатні до швидкого росту в офтальмологічних розчинах (Remington's Ophthalmic Preservatives, глава 86, 1588). Таким чином, використання гіалуронатних комплексів цинку і кобальту в офтальмології може бути дуже важливим, завдяки їх високій активності проти обох вищезгаданих різновидів мікроорганізмів.

Антимікробна дія композицій була перевірена у мікробіологічних дослідженнях. Для цих досліджень використовували розчини гіалуронату цинку і дистильованій воді (вода для ін'єкцій, апірогенна, стерильна), потім об'єм довели до 50мл двічі-дистильованою водою. Колбу залишили для набрякання протягом ночі, потім розчинили шляхом збовтування і заповнили двічі-дистильованою водою. Після фільтрування розчину крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45мкм отримали розчин, що містив 0,50% гіалуронату цинку.

Приклад 2

Отримання 100мл 0,5% розчину гіалуронату натрію 0,50г гіалуронату натрію, що використовували у прикладі 1, розчинили у 100мл двічі-дистильованої води (вода для ін'єкцій, апірогенна, стерильна), як описано раніше, щоб одержати 0,5% розчин гіалуронату натрію. Розчини 0,1 або 0,2%, відповідно отримані розведенням 0,5% розчину дистильованою водою вищезгаданої якості.

Перший ряд експериментів

0,2% розчини гіалуронату цинку і натрію (отримані розведенням 0,5% розчинів, приготованих відповідно до прикладів 1 і 2) були штучно інфіковані ідентичною кількістю одиниць різних іспитових організмів, і реєстрували зміну числа одиниць протягом часу. Кількість мікроорганізмів визначали на певних відрізках часу методом підрахунку колоній. Оцінку проводили візуально на плісняві, та використовували автоматизований лічильник колоній у випадку бактерій і грибів.

Використане поживне середовище: соєво-казеїновий агар (Caso-agar /Merck/).

Як тест-організми використовували мікроорганізми, зареєстровані у Національній колекції штамів Національного інституту охорони здоров'я (NHCMB).

Використані мікроорганізми:

Staphylococcus aureus,
 Streptococcus sp.,
 Escherichia coli,
 Salmonella sp.,
 Candida albicans,
 Aspergillus niger.
 Початкова кількість тест-організмів: $\Sigma 10^6$ /мл
 Число паралельних експериментів: 3
 Використані розчини:
 1-0,2% водний розчин гіалуронату цинку
 2-0,2% водний розчин гіалуронату натрію
 Результати наведено в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Вплив 0,2% водного розчину гіалуронату цинку проти різних тест-організмів (представлений як кількість тест-організмів на мл)

Тест-організм	Проміжок часу							
	0 год	1 год	2 год	3 год	4 год	5 год	6 год	24 год
Staphylococcus aureus	$4,80 \times 10^5$	$4,75 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	$3,60 \times 10^5$	$1,00 \times 10^4$	$8,00 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$
Streptococcus sp.	$5,10 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$3,60 \times 10^4$	$2,80 \times 10^4$	$1,50 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^2$	<100
Escherichia coli,	$5,40 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$8,80 \times 10^4$	$4,20 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$	$3,00 \times 10^4$	$2,50 \times 10^4$	$2,00 \times 10^3$
Salmonella sp.,	$5,10 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	$3,50 \times 10^4$	$8,00 \times 10^3$	$5,00 \times 10^3$	$4,00 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3$	0
Candida albicans,	$5,20 \times 10^5$	$4,80 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$9,00 \times 10^4$	$5,00 \times 10^4$	$4,20 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$	$1,60 \times 10^2$
Aspergillus niger	$4,20 \times 10^5$	$3,40 \times 10^4$	$3,80 \times 10^4$	$3,60 \times 10^4$	$2,80 \times 10^4$	г.еoxTo	$1,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$

Таблиця 2

Вплив 0,2% водного розчину гіалуронату натрію проти різних тест-організмів (представлений як кількість тест-організмів на мл)

Тест-організм	Проміжок часу							
	0 год	1 год	2 год	3 год	4 год	5 год	6 год	24 год
Staphylococcus aureus	$5,00 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,80 \times 10^5$	$4,85 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$
Streptococcus sp	$4,40 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$4,25 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$3,80 \times 10^5$
Escherichia coli,	$5,20 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$4,95 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$4,80 \times 10^5$
Salmonella sp.,	$5,10 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	$4,80 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$
Candida albicans,	$4,20 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$
Aspergillus niger	$4,00 \times 10^5$	$3,80 \times 10^5$	$3,80 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5$	$4,00 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$

З результатів, наведених вище в таблицях 1 і 2 можна побачити, що суттєва різниця в антимікробних впливах з'являється через 24 години. 0,2% розчин гіалуронату цинку викликав зменшення на декілька порядків більшості досліджуваних тест-організмів, тоді як кількість тест-організмів не була помітно змінена у розчині гіалуронату натрію.

Другий ряд експериментів

З метою довести антимікробний ефект гіалуронату цинку, далі експерименти були продовжені з розчинами іншої концентрації, чим 0,2%, разом із різними продовженнями часу дослідження. Ефекти 0,1% розчинів гіалуронату цинку і гіалуронату натрію на трьох різних тест-організмах відповідно проілюстровано в таблиці 3.

Таблиця 3

Час	Staphylococcus aureus, тест-організмів/мл		Salmonella sp., тест-організмів/мл		Pseudomonas aeruginosa, тест-організмів/мл
	Zn-hy	Na-hy	Zn-hy	Na-hy	Zn-hy
0 год.	$4,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
24 год.	$2,6 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
48 год.	0	$6,2 \times 10^5$	0	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
72 год.	0	$8,4 \times 10^5$	0	$1,8 \times 10^5$	<100
96 год.	0		0		<100
168 год.	0		0		0

Можна помітити, що в експериментах з гіалуронатом цинку, кількість тест-організмів Staphylococcus та Salmonella була зменшена фактично до нуля в межах 48 годин, тоді як результати досліджень з гіалуронатом натрію фактично залишилися в межах того ж порядку. Більш повільний прояв результатів спостерігали на Pseudomonas aeruginosa, де суттєве зменшення з'являлося тільки з другого дня.

Третій ряд експериментів

Через офтальмологічну важливість Pseudomonas aeruginosa, вплив розчинів гіалуронату цинку різних

концентрацій на *Pseudomonas aeruginosa* вивчалися в порівнянні з розчинами гіалуронату натрію тих же концентрацій. Результати зведено в таблиці 4 і 5.

Таблиця 4

Вплив гіалуронату
цинку на *Pseudomonas aeruginosa*

Час	Розчини гіалуронату Zn		
	0,1%	0,2%	0,5%
	тест-організмів/мл		
0год.	$5,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
24год.	$5,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$
48год.	$2,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
72год.	<100	<100	<100

Таблиця 5

Вплив гіалуронату
натрію на *Pseudomonas aeruginosa*

Час	Розчини гіалуронату Na		
	0,1%	0,2%	0,5%
	тест-організмів/мл		
0год.	$1,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
24год.	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
48год.	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
72год.	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5$

З результатів таблиць з'являється вигідна картина, а саме: розчини гіалуронату цинку очевидно більш ефективні, чим розчини гіалуронату натрію, та 0,1% розчин гіалуронату цинку виявляє таку ж саму активність, як 0,2% або 0,5% розчин гіалуронату цинку. Виходячи з цих результатів, можна розробити ефективну композицію для зовнішнього використання.

Антибактеріальна дія гіалуронату кобальту (II) була також досліджена. Отримання розчину гіалуронату кобальту описано в прикладі 3.

Приклад 3

Отримання 0,1% розчину гіалуронату кобальту

Після зважування 0,10г гіалуронату натрію згідно з прикладом 1 у 100мл колбі, додали 2,50мл розчину хлориду кобальту концентрації 0,10моль/л, приготованого на двічі-дистильованій воді (вода для ін'єкцій, апірогенна, стерильна), потім об'єм довели до 50мл двічі-дистильованою водою. Колбу залишили для набрякання протягом ночі, потім розчинили шляхом збовтування і, нарешті, заповнили двічі-дистильованою водою. Після фільтрування розчину крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45мкм, отримали розчин гіалуронату кобальту концентрації 0,10%.

Четвертий ряд експериментів

Мікробіологічні дослідження були проведені таким же чином, як описано вище, за винятком того, що замість *Salmonella* sp. використовували бактерії *E. coli*. Результати зведено до таблиці 6.

Таблиця 6

Час	Staphylococcus aureus, тест-організмів/мл		E. coli, тест-організмів/мл	
	0,1% р-н Na-ny	0,1% р-н Co-hy	0,1% р-н Na-hy	0,1% р-н Co-hy
0год.	$3,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
4год.	$2,1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
24год.	$1,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
48год.	$5,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$5,5 \times 10^5$	$9,0 \times 10^2$
72год.	$2,8 \times 10^5$	<10	$5,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$
96год.	$1,5 \times 10^5$	<10	$1,3 \times 10^5$	<10
168год.	$1,6 \times 10^5$	<10	$2,5 \times 10^5$	<10

З наведених вище у таблиці 6 результатів видно, що розчин гіалуронату кобальту виявляє активність, подібну до розчинів гіалуронату цинку на обох досліджуваних тест-організмах, тоді як порівняльні розчини гіалуронату натрію виявилися неактивними і в цьому випадку, якщо взяти до уваги похибки методів вимірювання.

П'ятий ряд експериментів

Антибактеріальний ефект гіалуронатного асоціату цинку може бути характеризований наступними величинами мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) і бактерицидної концентрації (CID) у порівнянні з відповідними величинами гіалуронату натрію.

Значення MIC і CID визначали використовуючи розчини у концентрації 0,2%. Визначення здійснювалися відомим способом: з іспитових речовин приготували послідовні розведення, і ці розчини штучно інфікували

відповідними розведеннями відібраних тест-організмів. Після інкубації при відповідній температурі протягом певного часу, візуально оцінювали серії концентрацій і визначали мінімальну концентрацію, що інгібувала ріст мікроорганізмів (значення MIC), або індукувала загибель мікроорганізмів (значення CID). Результати зведено до таблиці 7.

Таблиця 7

Значення MIC і CID для гіалуронату цинку (мкг/мл)

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
MIC	40	5,4		96	26
CID	120	160		400	310

0,2% розчин палуронату натрію не виявляв інгібуючого ефекту на жоден з тест-організмів навіть у концентрації 2000мкг/мл тому величини MIC не змогли визначити.

З наведеної вище таблиці 7 видно, що значення MIC палуронату цинку вказують на значний мікробіологічний ефект сполуки, що є на декілька порядків кращим, чим відповідний ефект палуронату натрію.

Шостий ряд експериментів

Можливість перспективного офтальмологічного використання комплексів гіалуронової кислоти вимагає гарної мікробіологічної стабільності композицій, а саме, їхнього прийнятного опору інфікуванню різними мікроорганізмами. Для визначення мікробіологічної стабільності розчинів палуронатів цинку і кобальту у порівнянні з гіалуронатом натрію, що звичайно використовується в офтальмології, були проведені широкі дослідження. Також було досліджено, чи потрібно для зберігання розчинів, що містять гіалуронат цинку, використовувати якийсь зберігаючий засіб.

Ці дослідження були проведені відповідно до статті видання USP XXII (стор.1478), що має назву "Ефективність антимікробних зберігаючих засобів". Принципи цього дослідження наступні. Іспитову речовину штучно інфікували різними тест-організмами і спостерігали зміну індексу колоній-утворюючих одиниць як функцію від часу. Як тест-організми використовували мікроорганізми, зареєстровані у Національній колекції штамів Національного інституту охорони здоров'я (HNCMB). Дослідження здійснювали з розчинами гіалуронату цинку і натрію різних концентрацій у присутності зберігаючого засобу або без нього.

Індекс колоній-утворюючих одиниць (кількість зачатків) у зразках визначали методом підрахунку колоній (плівок плісняви). Оцінку здійснювали з використанням автоматизованого лічильника колоній для бактерій і грибів або візуально для плісняви.

Результати наведено в таблицях нижче. Кожний результат означає середнє значення трьох паралельних зразків, виражене у кількості колоній / мл.

Таблиця 8

Дослідження мікробіологічної стабільності 0,1% розчину гіалуронату цинку

Тест-організм	Час вимірювання										
	Старт, Огод.	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	14 день	21 день	28 день
<i>Staphylococcus aureus</i>	$5,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	<10	<10	<10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$5,6 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	<1	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	$1,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	10^2	<100	<100	<100	<10	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	$4,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
<i>Candida albicans</i>	$6,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	<100	<10	0

Таблиця 9

Дослідження мікробіологічної стабільності 0,2% розчину гіалуронату цинку

Тест-організм	Час вимірювання										
	Старт, Огод.	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	14 день	21 день	28 день
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,9 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	<10	<10	<10	<10	0	<10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,1 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	<1	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	$4,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	10^2	<10	<10	30	<10	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	$4,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	$6,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
<i>Candida albicans</i>	$3,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$6,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$9,8 \times 10^2$	<100	0

Таблиця 10

Дослідження мікробіологічної стабільності 0,5% розчину гіалуронату цинку

Тест-організм	Час вимірювання										
	Старт, 0 год.	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	14 день	21 день	28 день
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10$	$3,0 \times 10$	<100	10	<10	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$6,1 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	$5,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10$	$3,1 \times 10$	$1,6 \times 10$	<100	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	$4,8 \times 10^5$	$4,2 \times 10$	$3,6 \times 10$	$2,8 \times 10$	$2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$
<i>Candida albicans</i>	$1,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10$	$1,2 \times 10$	$9,0 \times 10$	$4,1 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0	0	0

Таблиця 11

Дослідження мікробіологічної стабільності 0,5% розчину гіалуронату цинку, що містить сорбат калію

Тест-організм	Час вимірювання										
	Старт, 0 год.	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	14 день	21 день	28 день
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^3$	20	<10	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	$6,7 \times 10^5$	$5,9 \times 10^4$	$4,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	<100	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	$4,6 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
<i>Candida albicans</i>	$4,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	0	0	0

Таблиця 12

Дослідження мікробіологічної стабільності 0,5% розчину гіалуронату натрію, що містить сорбат калію

Тест-організм	Час вимірювання										
	Старт, 0 год.	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	14 день	21 день	28 день
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,5 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	20	<10	<10	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$	<100	<100	10	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	$3,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$8,4 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	$8,4 \times 10^3$	$8,4 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	0
<i>Aspergillus niger</i>	$3,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$
<i>Candida albicans</i>	$9,8 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$	$7,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$

Відповідно до вимог, описаних у USP XXII, і загальних вимог, речовину вважають прийнятно збереженою, якщо кількість бактерій, введених штучним інфікуванням, зменшується на 99% протягом 14 днів; якщо тест-організми не розмножуються рівномірно протягом 14 днів; а також коли не спостерігається ніякого тимчасового росту будь-якого тест-організму протягом 28 днів дослідження.

З результатів дослідження можна бачити:

1. Мікробіологічна стабільність 0,1% розчину гіалуронату цинку відповідає положенням USP XXII, зважаючи, що 4 організми (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*) з 5 мікроорганізмів показали не тільки необхідний рівень загибелі, але й жодної живої одиниці не змогли виявити у пробі, взятій на 28-й день. Поведінка *Aspergillus niger* є регулярною і навіть виявляє зменшення на два порядки.

2. Мікробіологічна стабільність 0,2% розчину гіалуронату цинку є подібною до стабільності 0,1% розчину гіалуронату цинку, тобто вона відповідає вимогам USP XXII.

3. Стабільність 0,5% розчину гіалуронату цинку відповідає вимогам USP XXII, як і очікувалося; фактично, результати вказують на підвищення стабільності зі збільшенням концентрації гіалуронату цинку.

4. Властивості стабільності розчину, що містить 0,5% гіалуронату цинку і 0,1% сорбату калію, достатні, але

значно (значимо) не поліпшуються таким зберігаючим засобом як сорбат калію.

5. 0,5% розчин гіалуронату натрію, що містить 0,1% сорбату калію, також відповідає вимогам USP XXII у випадках з кожним тест-мікроорганізмом.

З цих результатів можна зробити дуже важливий висновок, що для розчину гіалуронату цинку не потрібно ніякого зберігаючого засобу, на відміну від гіалуронату натрію, що навіть у присутності зберігаючого засобу показує нижчу стабільність, чим розчин гіалуронату цинку. Зберігаючий засіб безумовно є необхідним для розчину гіалуронату натрію, інакше він стає легко інфікованим.

Такий висновок є дуже важливим, оскільки зберігаючі засоби можуть часто спричиняти алергічну реакцію, тому їхнє усунення робить використання гіалуронату цинку дуже перспективним, особливо в офтальмології.

Сьомий ряд експериментів

Характеристики мікробіологічної стабільності гіалуронату кобальту наведено в таблиці 13.

Таблиця 13

Мікробіологічна стабільність 0,1% розчину гіалуронату кобальту

Тест-організм	Час вимірювання				
	Контроль	День 0~30'	24год.	48год.	72год.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,5 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp.	$2,5 \times 10^4$	$4,8 \times 10^3$	0	0	0

З таблиці помітно, що мікробіологічна стабільність 0,1% розчину гіалуронату кобальту проти бактерій *Pseudomonas aeruginosa* є такою ж гарною, як і стабільність 0,1% розчину гіалуронату цинку.

Можна спостерігати, що після інокуляції з'являється майже негайний ефект. Після завершення з випробування протягом 72 годин, було проведено дослідження стерильності, результати якого показали, дія гіалуронату кобальту на перевірені бактерії не є статичною за характером, але це - бактерицидна дія.

Отримання офтальмологічних та дерматологічних композицій, відповідно, для зовнішнього використання описано в наступних прикладах.

Приклад 4

Краплі для очей, що містять гіалуронат цинку

Отримання 100мл крапель для очей, що містять 0,1% гіалуронат цинку

Для отримання крапель для очей використовували гіалуронат натрію, описаний у прикладі 1.

Після зважування 0,10г гіалуронату натрію якості "pulvis" (чистий порошок) у 100мл колбі, додали 1,87мл розчину хлориду цинку концентрації 0,10моль/літр і 27,50мл розчину сорбітолу концентрації 1,00моль/літр. (Розчини готували на двічі-дистильованій воді.) Потім об'єм довели до 50мл двічі-дистильованою водою. Залишили на ніч для набрякання, потім розчинили збовтуванням і заповнили до позначки двічі-дистильованою водою. Нарешті, розчин профільтрували крізь мембранний фільтр (розмір пор 0,45мкм).

Приклад 5

Дерматологічна композиція, що містить гіалуронат цинку

Отримання 100 г гелю, що містить 0,2% гіалуронат цинку

Характеристики гіалуронату натрію, використаного для отримання гелю:

Молекулярна вага: 800 000 дальтон

Вміст білка: 0,094 %

УФ поглинання: A : 0,320
257 нм

1 %
A : 0,240
280 нм

C → 0
В'язкість: η = 14,5dl/g
25°C

Вміст білка: 0,094%

1%

Вміст гіалуронової кислоти: 95,2%

Після розчинення 0,2г гіалуронату натрію у приблизно 30мл дистильованої води, додали 5,0мл 0,1 молярного розчину хлориду цинку.

1,0г гелеутворювача Carborol 934 змішали з 40мл дистильованої води, розмішували протягом 1-1,5 годин, настоювали від 10 до 12 годин, і потім додали 1,0мл 20% розчину гідроксиду натрію.

Попередньо приготований розчин гіалуронату цинку профільтрували крізь фільтр з розмірами пор

0,45мкм, влили до гелю при безупинному перемішуванні, потім довели об'єм до 100мл дистильованою водою. Гарні результати досліджень стабільності, отримані на видах грибків та плісняви, наведені у таблицях з 8 до 12, показують, що гіалуронат цинку має не тільки антибактеріальну, але також суттєву антигрибкову дію.

Восьмий ряд експериментів

Ефективність композицій на бактеріях *Helicobacter pylori* також має подібну велику важливість. Завдяки такій дії, композиції є корисними у лікуванні або профілактиці розвитку шлункових і дуоденальних виразок та, головним чином, для запобігання повторного інфікування після загоєння.

Дослідження ефективності проти бактерій *Helicobacter pylori*

Ці дослідження були проведені з використанням 1,0вага/об'єм % розчину гіалуронату цинку на штамх *Helicobacter pylori*, культивованих зі зразків шлункової біопсії від пацієнтів, що страждають від різних виразок. 1% Розчин Де-Нолу (De-Nol - колоїдний основний цитрат вісмуту) використовували як контрольну речовину. Для досліджень використовували агарове культиваційне середовище (поживне середовище) з додаванням 10% бичачої крові. Як контроль використовували чашки без досліджуваної сполуки. Інокульовані чашки інкубували від 3 до 5 днів при 37°C у газовому середовищі, що містило 5% кисню та від 7 до 8% вуглекислого газу. Значенням мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) вважали мінімальну концентрацію речовин, що повністю інгібувала розмноження бактерій, які добре росли на контрольних чашках. Значення MIC гіалуронату цинку та Де-Нолу, відповідно, виміряні на тест-штамах, наведені в таблиці 14.

Таблиця 14

Штам	Гіалуронат цинку MIC, мкг/мл	Де-нол MIC, мкг/мл
822/96	500	500

З результатів, наведених у таблиці, очевидно, що вплив гіалуронату цинку *in vitro* на *Helicobacter pylori* є порівняним впливу Де-Нолу, який використовується в терапії. Цей факт вартий уваги, оскільки Де-Нол - це композиція, що містить вісмут, який має побічні ефекти (проблеми токсичності; крім того, його ковтання неприємне для пацієнта), якими не можна нехтувати, тоді як при використанні гіалуронату цинку такі побічні ефекти не очікуються.