

УДК 546.55/.59, 546.72, 544.77

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫЙ СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ СИСТЕМ ГЕНТАМИЦИНА СУЛЬФАТА С НАНОЧАСТИЦАМИ МЕДИ И ЖЕЛЕЗА

О.И. Верная, В.П. Шабатин, А.М. Семенов, Т.И. Шабатина*, М.Я. Мельников

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической кинетики; *e-mail: tatyanaashabatina@yandex.ru)

Методы криохимической модификации использованы для получения гибридных композитов антибактериального препарата гентамицина сульфата и наночастиц меди и железа, которые являются перспективными прекурсорами систем направленной доставки. Полученные системы представляют собой наночастицы антибиотика размером 50–300 нм, включающие наночастицы меди и железа размером 1–20 нм (согласно результатам физико-химического анализа, проведенного методами ИК-спектроскопии, рентгенофазового анализа, динамического светорассеяния, растровой и просвечивающей микроскопии). Полученные композиты проявили более высокую антибактериальную активность в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. cereus* по сравнению с индивидуальными компонентами.

Ключевые слова: наночастицы железа, наночастицы меди, гентамицина сульфат, антибактериальная активность.

В последние годы растет число публикаций, показывающих актуальность использования в медицине неорганических наночастиц (металлов и их оксидов), а также систем на основе этих частиц и лекарственных веществ. Наночастицы серебра и меди проявляют активность в отношении патогенных микроорганизмов, в том числе резистентных к антибиотикам [1–4]. Наночастицы цинка ускоряют заживление ран [5], а наночастицы магнетита и маггемита используют при проведении гипертермии, а также в качестве агентов для магниторезонансной томографии [6, 7]. Композиты на основе антибактериальных препаратов, наночастиц серебра и меди обладают более широким спектром бактерицидного действия и более высокой активностью по сравнению с индивидуальными компонентами [8–15]. Совместное использование магнитных наночастиц с противоопухолевыми препаратами позволяет направить лекарственное вещество в целевой орган и сочетать гипертермию с химиотерапией.

Цель настоящей работы – получение гибридных систем на основе антибактериального препарата гентамицина сульфата, наночастиц меди и железа. Сочетание гентамицина сульфата и наночастиц меди способствует синергетическому возрастанию антибактериальной активности и позволяет расширить бактерицидный спектр действия

препарата [13], а магнитные свойства наночастиц железа делают их перспективными магнитными векторами для направленной доставки гибридных систем в целевой орган.

Экспериментальная часть

Субстанцию гентамицина сульфата, соответствующую фармакопейной статье 42-2626-89, хлорид меди(II), хлорид железа(III) и гидразина гидрат («х.ч.», «Русхим») и боргидрид натрия 99%-й чистоты фирмы «Aldrich» использовали без предварительной очистки. Синтез наночастиц железа проводили под воздействием ультразвука в ультразвуковой ванне «Сапфир» (Россия) по методике, описанной в [16]. Наночастицы меди получали согласно [17]. Полученные коллоидные растворы подвергали многократному декантированию (пока не убедились в отсутствии реакции на хлорид-ионы с AgNO_3), затем замораживали жидким азотом и подвергали лиофильной сушке.

Гибридные нанокompозиты на основе гентамицина сульфата с наночастицами меди и железа ($\text{Cu} / \text{Fe} /$ гентамицина сульфат) получали распылением водного раствора (1% гентамицина сульфат, 0,01% Ag, 0,01% Fe) через пневматическую форсунку в жидкий азот, затем замороженные растворы помещали в лиофильную сушку «VirTis Wizard 2.0» (США) на 24 ч (интервал

Межплоскостные расстояния и значения относительной интенсивности, рассчитанные на основании данных РФА для полученных порошков металлов

Cu		α -Fe	
$d, \text{Å}$	$I, \%$	$d, \text{Å}$	$I, \%$
2,09	100	2,01	100
1,81	38	1,17	23
1,28	21	–	–

температуры: на конденсаторе (–50) – (–55) °С; на продукте (–196) – (+400) °С, остаточное давление в камере (6–8) · 10^{–2} Торр [18].

Рентгенофазовый анализ (РФА) порошкообразных образцов проводили на дифрактометре «Rigaku D/MAX-2500» (Япония) на CuK α -излучении ($\lambda = 1,54056 \text{ Å}$). Микрофотографии образцов получали на просвечивающем электронном микроскопе «LEO 912 AB Omega» («Zeiss», Германия) и сканирующем (растровом) электронном микроскопе «Phenom» («FEI Company», Германия). Удельную поверхность полученных высокодисперсных образцов определяли методом низкотемпературной адсорбции аргона на базе катарометра «Хром 5». Размер частиц оценивали по формуле $d = 6/\rho S$, где d – средний диаметр получаемых частиц, S – удельная поверхность частиц, ρ – плотность гентамицина сульфата. ИК-спектры порошков образцов получали в интервале 4000–400 см^{–1} на спектрометре «Bruker Tensor II» (Германия) с приставкой «ATR platinum». Регистрацию ИК-спектров порошкообразных образцов осуществляли по методике диффузного отражения. Размер наночастиц металлов до включения в гибридные композиты определяли методом динамического светорассеяния с использованием системы для определения размеров частиц (DLS) во взвешях наночастиц («Brookhaven Instruments», США). Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР ¹H) регистрировали в растворе в дейтерированной воде (D₂O) на ЯМР-спектрометре высокого разрешения «VXR-400» фирмы «Varian» (США).

Определение антибактериальной активности образцов осуществляли диско-диффузионным методом, применяя диски фильтровальной бумаги. В качестве тест-культур использовали бактериальные клетки, полученные из коллекции бактериальных культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*). Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя

среды 4 мм). Измерение зон подавления роста (ЗПР) тест-культур проводили после 24 ч инкубации. Статистически достоверные результаты получали девятикратным повторением измерений ЗПР для каждой серии образцов.

Результаты и их обсуждение

Для выяснения состава и структуры образцов был проведен физико-химический анализ. Перед включением в гибридные композиты наночастицы металлов в виде коллоидных растворов были охарактеризованы методом динамического светорассеяния. Их средние размеры составили 6 и 9 нм для железа и меди соответственно. Состав полученных металлических нанопорошков был подтвержден методом рентгенофазового анализа. Межплоскостные расстояния, рассчитанные на основании рентгеновских дифрактограмм полученных порошков металлов представлены в таблице.

Заметное уширение пиков железа и меди обусловлено их размером и хорошо согласуется с результатами, полученными методом динамического светорассеяния.

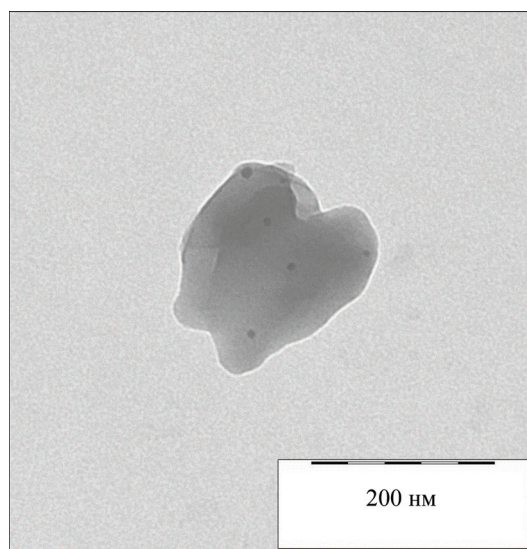


Рис. 1. Микрофотография ПЭМ гибридных композитов гентамицина сульфата с наночастицами железа и меди

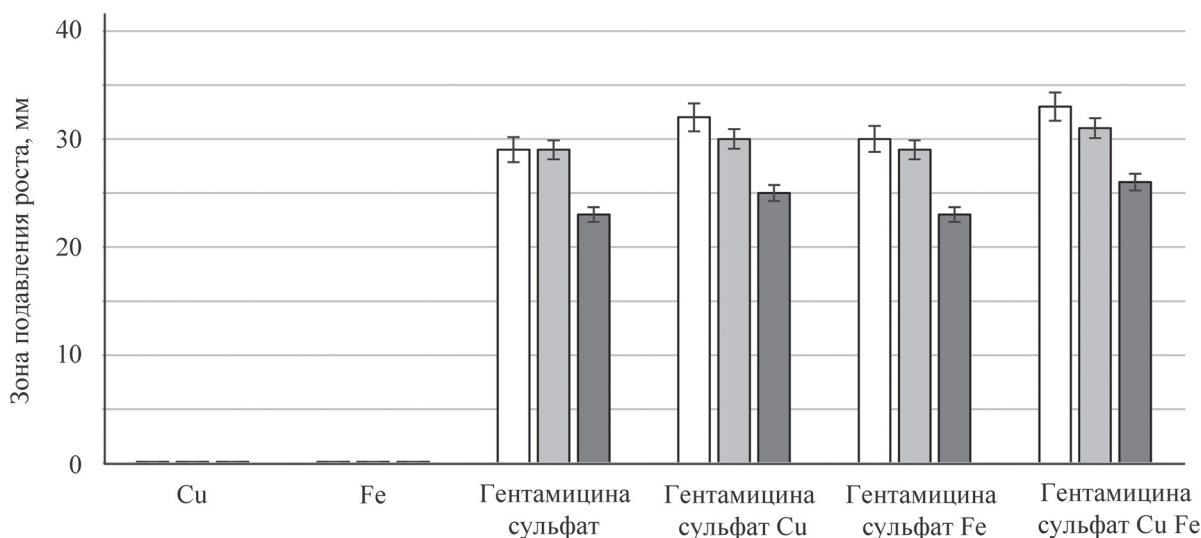


Рис. 2. Зона подавления роста (мм) *E. coli* (1), *P. aeruginosa* (2), *B. cereus* (3) вокруг дисков фильтровальной бумаги, пропитанных растворами (0,3 мас.%) систем гентамицина сульфата с наночастицами железа и меди, а также индивидуальными компонентами систем (0,3 мас.% антибактериального препарата; 0,03 мас.% железа; 0,03 мас.% меди)

В ИК-спектрах гибридных композитов гентамицина сульфата с наночастицами железа и меди видны полосы групп NH_2^+ , NH_3^+ при $1520, 1625, 3280 \text{ см}^{-1}$, HSO_4^- , C–O при 1059 см^{-1} и SO_2 при 607 см^{-1} , характерные для гентамицина сульфата. Сдвигов полос групп C–O и SO_2 не наблюдается, что обусловлено не отсутствием взаимодействия ионов железа и меди с соответствующими группами, а низкой интенсивностью соответствующих пиков, связанной с низким содержанием металлов в образцах (1%). Спектры ЯМР ^1H гибридных композитов гентамицина сульфата с наночастицами железа и меди соответствуют литературным данным для гентамицина сульфата [19].

На микрофотографиях гибридных систем Cu / Fe / гентамицина сульфат, полученных методом просвечивающей (ПЭМ) и растровой (РЭМ) электронной микроскопии видно, что полученные системы представляют собой органические частицы размером 50–300 нм. Точечный элементный анализ поверхности образцов показывает, что помимо элементов, образующих гентамицина сульфат (C, N, O, S), образцы содержат Fe и Cu. Согласно микрофотографиям ПЭМ, органические частицы содержат более мелкие частицы размером 1–20 нм (рис. 1).

Результаты изучения активности полученных композитов в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. cereus* по сравнению с гентамицина сульфатом, наночастицами металлов и гибридными системами Cu / гентамицина сульфат и Fe / гентамицина сульфат приведены на рис. 2. Полученные композиты Cu / Fe / гентамицина сульфат проявили более высокую активность в отношении бактериальных штаммов по сравнению с индивидуальными компонентами и гибридными системами, содержащими гентамицин и железо, а также сравнимую активность с системами, содержащими гентамицина сульфат и наночастицы меди.

Таким образом, используя низкотемпературные технологии, мы получили гибридные наносистемы, состоящие из частиц гентамицина сульфата размером 50–300 нм, включающих наночастицы меди и железа, которые проявили более высокую активность в отношении *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. cereus* по сравнению с индивидуальными компонентами.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-13-10365).

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Panáček A., Kvítek L., Prucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V. K., Nevěčná T., Zbořil R. // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. N 33. P. 16248.
2. Rai M., Yadav A., Gade A. // Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27. P.76.

3. Raffi M., Mehrwan S., Mahmood T., Javed B., Akhter I., Hameed A., Yawar W., Hasan M. // Ann Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 75.
4. Hamouda I. M. // Journal of Biomedical Research. 2012. Vol. 26. N 3. P. 143.
5. D. Luong, Yergeshov A.A., Zoughaib M., Sadykova F.R., Gareev B.I., Savina I.N., Abdullin T.I. // Materials Science and Engineering: C. 2019. Vol. 103. P. 109759.
6. Михайлов Г.А., Васильева О.С. // Бюл. СО РАМН. 2008. Vol. 131. № 3. С. 18.
7. Wang X., Zhuang J., Peng Q., Yadong L. // Nature. 2005. Vol. 437. P. 121.
8. Geoprincy G., Saravanan P., Gandhi N.N., Renganathan S. // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2011. Vol. 6. N 4. P. 1557.
9. Naqvi S.Z.H., Kiran U., Ali M.I., Jamal A., Hameed A., Ahmed S., Ali N. // International Journal of Nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 3187.
10. Gurunathan S. // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2015. Vol. 29. P. 217.
11. Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S. // Nanotechnol. Biol. Medicine. 2007. Vol. 3. P. 168.
12. Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R. // Nanotechnol. Biol. Medicine. 2010. Vol. 6. P. 103.
13. Vernaya O.I., Shabatin V.P., Nuzhdina A.V., Zyukova N.D., Khvatov D.I., Semenov A.M., Lozinskii V.I., Shabatina T.I., Melnikov M.Ya // Russian Chemical Bulletin. 2017. Vol. 66. N 11. P. 2152.
14. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Karlova D.L., Nuzhdina A.V., Shabatin V.P., Semenov A.M., Lozinskii V.I., Melnikov M.Y. // Nanotechnologies in Russia. 2018. Vol. 13. N 9–10. P. 546.
15. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Nuzhdina A.V., Zyukova N.D., Shabatin V.P., Semenov A.M., Lozinskii V.I., Melnikov M.Y. // Nanotechnologies in Russia. 2018. Vol. 13. N 3–4. 182.
16. Saikova S.V., Vorob'ev S.A., Nikolaeva R.B., Mikhailin Yu.L. // Russ. J. Gen. Chem. 2010. Vol. 80. N 6. P. 1122.
17. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Shabatin V.P., Evseeva, I.V., Melnikov M.Y., Fitch A.N., Chernyshev V.V. // Crystals. 2018. Vol. 8. N 7. P. 298.
18. Deubner R., Schollmayer C., Wiene F., Holzgrabe U. // Magn. Reson. Chem. 2003. Vol. 41. P. 589.

Поступила в редакцию 10.12.2019

Получена после доработки 12.12.2019

Принята к публикации 14.12.2019

LOW TEMPERATURE SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HYBRID SYSTEMS OF GENTAMICINE SULPHATE WITH COPPER AND IRON NANOPARTICLES

O.I. Vernaya, V.P. Shabatin, A.M. Semenov, T.I. Shabatina*, M.Ya. Melnikov

(Moscow State University M.V. Lomonosov, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Kinetics; *e-mail: tatyana-shabatina@yandex.ru)

Cryochemical modification methods were used to obtain hybrid composites of the antibacterial drug gentamicin sulfate and copper and iron nanoparticles, which are promising precursors of targeted delivery systems. The resulting systems are antibiotic nanoparticles with a size of 50–300 nm, including copper and iron nanoparticles with a size of 1–20 nm (according to the results of physicochemical analysis by IR spectroscopy, X-ray diffraction analysis, dynamic light scattering, scanning and transmission microscopy). The obtained composites showed higher antibacterial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* compared to the individual components.

Ключевые слова: iron nanoparticles, copper nanoparticles, gentamicin sulfate, antibacterial activity.

Сведения об авторах: Верная Ольга Ивановна – науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (olga_vernaya@mail.ru); Шабатин Владимир Петрович – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (vovapsh@ Rambler.ru); Семенов Александр Михайлович – вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук (amsemenov@list.ru); Шабатина Татьяна Игоревна – зав. лабораторией химии низких температур, вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент, докт. хим. наук (tatyana-shabatina@yandex.ru); Мельников Михаил Яковлевич – зав. кафедрой химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор.