

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 66.049.7, 577.18, 577.114

КРИОФОРМИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА СИСТЕМ ДИОКСИДИН / ЖЕЛАТИН

Ольга Ивановна Верная¹, Алексей Сергеевич Шумилкин², Дарья Львовна Карлова³, Анна Сергеевна Шевченко⁴, Алина Алексеевна Макеева⁵, Андрей Владимирович Шабатин⁶, Александр Михайлович Семенов⁷, Татьяна Игоревна Шабатина⁸, Михаил Яковлевич Мельников⁹

^{1-5, 8, 9} Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет

⁶ Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет

^{1, 8} Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана

Автор, ответственный за переписку: Ольга Ивановна Верная, olga_vernaya@mail.ru

Аннотация. Проведено криоформирование систем на основе желатина с антибактериальным препаратом диоксидином. Рассмотрено влияние условий синтеза систем (концентрации желатина в растворе-предшественнике и температура его замораживания) на их структурные характеристики, антибактериальную активность и время высвобождения лекарственного вещества. Состав и структура систем диоксидин / желатин и диоксидин / гидролизованный коллаген охарактеризованы методами СЭМ, ИК- и УФ-спектроскопии. Для установления антибактериальной активности полученных систем в отношении *E. coli* и *S. aureus* использовали стандартный диско-диффузионный метод.

Ключевые слова: желатин, диоксидин, криомодифицирование, криосинтез, контролируемое высвобождение, биополимеры

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант РНФ № 22-63-00006.

Для цитирования: Верная О.И., Шумилкин А.С., Карлова Д.Л., Шевченко А.С., Макеева, А.А., Шабатин А.В., Семенов А.М., Шабатина Т.И., Мельников М.Я. Криоформирование и свойства систем диоксидин / желатин // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 64. № 1. С. 11–18.

ORIGINAL ARTICLE

CRYOFORMATION AND PROPERTIES OF DIOXIDIN/GELATIN SYSTEMS

Olga I. Vernaya¹, Alexey S. Shumilkin², Darya L. Karlova³, Anna S. Shevchenko⁴, Alina A. Makeeva⁵, Andrey V. Shabatina⁶, Alexandr M. Semenov⁷, Tatiana I. Shabatina⁸, Mikhail Ya. Melnikov⁹

^{1-5, 8, 9} Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry

⁶ Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry

⁷ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology

^{1, 8} Bauman Moscow State Technical University

Corresponding author: Olga I. Vernaya, olga_vernaya@mail.ru

Abstract. Cryoforming of gelatin systems with the antibacterial drug dioxidine was carried out. The paper considers the effect of system synthesis conditions (gelatin concentration in the precursor solution) on their structural characteristics, antibacterial activity, and drug release time. The composition and structure of the dioxidine/gelatin and dioxidine/hydrolyzed collagen systems were characterized by SEM, IR and UV spectroscopy. The disk diffusion method was used to determine the antibacterial activity of the obtained systems against *E. coli* and *S. aureus*.

Keywords: gelatin, dioxidin, cryomodification, cryosynthesis, controlled release, biopolymer

Financial Support. The work was supported by the Russian Science Foundation, RGNF grant No. 22-63-00006.

For citation: Vernaya O.I., Shumilkin A.S., Karlova D.L., Shevchenko A.S., Makeeva A.A., Shabatin A.V., Semenov A.M., Shabatina T.I., Melnikov M.Ya. Cryoformation and Properties of Dioxidin/Gelatin Systems // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 64. N 1. P. 11–18.

Развитие современной медицины показывает, что эффективность действия лекарственных веществ во многом определяется размером их частиц [1], возможностью их адресной доставки к поврежденным органам и контролируемым высвобождением в течение определенного времени [2]. Многие современные лекарственные вещества плохо растворимы в воде, хотя одним из основных свойств, определяющих эффективность применения органических соединений в качестве лекарственных препаратов, является скорость их растворения, зависящая от размера частиц вещества. [3] Уменьшение размера частиц лекарственных веществ увеличивает их биодоступность как в результате повышения скорости растворения, так и благодаря проницаемости биологических барьеров для частиц с размером менее 200 нм. Поэтому синтез наночастиц лекарственных веществ становится одним из основных направлений создания новых высокоэффективных лекарственных препаратов [4–6].

Перспективны терапевтические препараты с контролируемым высвобождением лекарственных веществ, в том числе лекарственные формы, при введении которых в организм высвобождение лекарственных молекул происходит дольше, чем в случае обычных лекарственных форм [7, 8]. Создание лекарственных форм контролируемого действия приводит также к снижению пиковой концентрации и устранению временных колебаний концентрации активного вещества в крови и тканях организма, неизбежных при периодически повторяющихся приемах обычных лекарственных препаратов. Такие

лекарственные формы могут быть получены путем связывания фармакологически активных компонентов с биополимерной матрицей, которая обеспечивает постепенный выход из нее лекарственного вещества и длительное поддержание необходимой концентрации действующего препарата в организме или локально в определенном органе-мишени [9]. В качестве возможных «депо» матриц для наночастиц лекарственных препаратов могут быть использованы системы на основе таких биополимеров, как альгинат кальция [10, 11], бычий сывороточный альбумин [12] и желатин [13, 14]. Желатиновые биополимеры легко и в необходимом количестве могут быть получены непосредственно из биологических источников. Они нетоксичны, биосовместимы и биоразлагаемы, так как метаболизируются пищеварительными ферментами в безвредные пептиды, тогда как синтетические полимеры могут накапливаться в организме. Полимерные матрицы на основе желатина обладают также низкой иммуногенностью. Отсутствие затрат на синтез новых лекарственных веществ делает их выгодными и с экономической точки зрения.

Желатин активно используют в медицине и фармацевтике при производстве капсулированных лекарств, в качестве матриц и покрытий для имплантатов, как стабилизатор в вакцинах против кори, эпидемического паротита, краснухи, японского энцефалита, бешенства, дифтерии и столбняка. В настоящее время рядом научных групп желатиновые биополимерные матрицы используются в качестве носителей в системах направленной доставки или для обе-

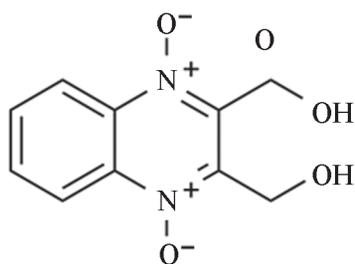


Рис. 1. Структурная формула диоксидина

спечения контролируемого высвобождения лекарственных веществ [15–18].

В качестве тестового лекарственного препарата в работе использован антибактериальный препарат широкого спектра действия диоксидин (2,3-бис-(гидроксиметил)хиноксалина 1,4-ди-N-оксид). Диоксидин (рис. 1) является производным ди-N-окси хиноксалина и применяется при лечении гнойных бактериальных инфекций, поверхностных и глубоких ран различной локализации, длительно незаживающих ран и трофических язв, флегмон мягких тканей, инфицированных ожогов, гнойных ран при остеомиелитах, гнойных плевритах, эмпием плевры, перитонитов, циститов, гнойных процессов в грудной и брюшной полости. Этот препарат оказывает влияние как на грамотрицательные, так и на грамположительные аэробные и анаэробные бактерии. Механизм бактерицидного действия препарата – повреждение ДНК бактерии. Раствор препарата имеет желтую окраску, и его высвобождение в водные и биологические среды легко отслеживается спектрофотометрически.

Цель настоящей работы – криоформирование гибридных систем диоксидин / желатин, а также установление взаимосвязей между условиями криоформирования систем, их структурой и кинетикой высвобождения лекарственного вещества.

Экспериментальная часть

Субстанцию диоксидина, соответствующую фармакопейной статье 42-2308-97, желатин из свиной шкуры (тип «А», «Sigma-Aldrich G1890»), формалин («Русхим», Россия) марки ФМ, физиологический раствор («СОЛЮфарм», Россия) ГОСТ 4233-77 использовали без предварительной очистки.

Для получения систем диоксидин / желатин в 50 мл дистиллированной воды при нагревании на водяной бане при 40–60 °С и перемешивании растворяли 0,5 г диоксидина и от 0,5 до

5 г желатина. Полученные растворы помещали в стальные поддоны и замораживали на полке лиофильной сушилки при (–30 °С) или жидким азотом (–196 °С) и помещали на 24 ч в лиофильную сушилку «Advantage wizard 2:0» («VirTis», США) при температуре на конденсаторе –50... –55 °С; постепенном нагревании продукта от –30 до +30 °С и остаточном давлении в камере (6–8)·10^{–2} Торр. Высушенные диски образцов помещали на 60 мин в эксикатор с формалином для сшивания полимерной матрицы.

ИК-Фурье-спектры порошкообразных образцов снимали по методике неполного внутреннего отражения в диапазоне 4000–400 см^{–1} по 32 скана с разрешением 1 см^{–1} на спектрометре «Bruker Tensor II» (Германия) с приставкой «ATR platinum».

Микрофотографии систем диоксидин / желатин регистрировали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью электронного микроскопа «FEI QUANTA 650 FEG» («Thermo Fisher Scientific», Хиллсборо, Орегон, США) Центра коллективного пользования Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Регистрацию микрофотографий осуществляли при ускоряющем напряжении 5 кВ в высоком вакууме с детектором вторичных электронов.

Кинетику высвобождения из желатиновых матриц диоксидина и его УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «Jasco V-770» («Jasco», Япония) при $\lambda = 375$ нм и в интервале 200–500 нм. Образцы равного объема помещали в стакан с 50 мл физиологического раствора, через промежуток времени отбирали пробу в 1 мл и определяли ее поглощение при 375 нм, а затем возвращали обратно.

Антибактериальную активность гибридных композитов антибактериальных препаратов определяли стандартным диско-диффузионным методом с использованием дисков Диоксидин / желатин ($d = 0,4$ мм, $h = 2$ мм). В качестве тест-культур использовали штаммы бактерий *E. Coli 52* и *S. Aureus 144* из коллекции культур кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Эксперименты проводили в чашках Петри, содержащих 20 мл агаризованной питательной среды, подсушенной в течение суток (толщина слоя среды 4 мм). Измерение зон задержки роста (ЗЗР) тест-культур проводили через 24 ч инкубации.

Результаты и их обсуждение

Синтез систем диоксидин / желатин проводили с использованием водных растворов-

предшественников с постоянной концентрацией диоксида (1 мас.%) и концентрацией полимера, варьирующей от 1 до 10 мас.% (диоксидин / 1–10% желатин). Замораживание проводили при -30 и -196 °С (диоксидин / желатин-30 и диоксидин / желатин-196). Объемы растворов-предшественников были постоянны, при их замораживании использовали одинаковые формы, поэтому диски систем диоксидин / желатин различались по плотности. Они содержали равное количество диоксида, но различное количество полимерной составляющей.

ИК-спектры полученных систем содержали полосы функциональных групп как диоксида, так и желатина (рис. 2). Наблюдаемый сдвиг

полос валентных и деформационных колебаний ($\Delta\nu$, см^{-1}) ОН- и NO-групп диоксида, валентных колебаний NH-групп желатина и полос Амид 1 и Амид 2 (таблица) позволяет предположить наличие донорно-акцепторных взаимодействий этих групп матрицы и лекарственного препарата.

УФ-спектр выделившегося в физиологический раствор компонента систем диоксидин / желатин соответствовал диоксидину. В нем присутствуют интенсивные поглощения при 240 и 256 нм, относящиеся к переходу $\pi \rightarrow \pi^*$ электронов атомов ароматической системы, и полоса низкой интенсивности при 375 нм, относящаяся к переходу $n \rightarrow \pi^*$ с участием неспарен-

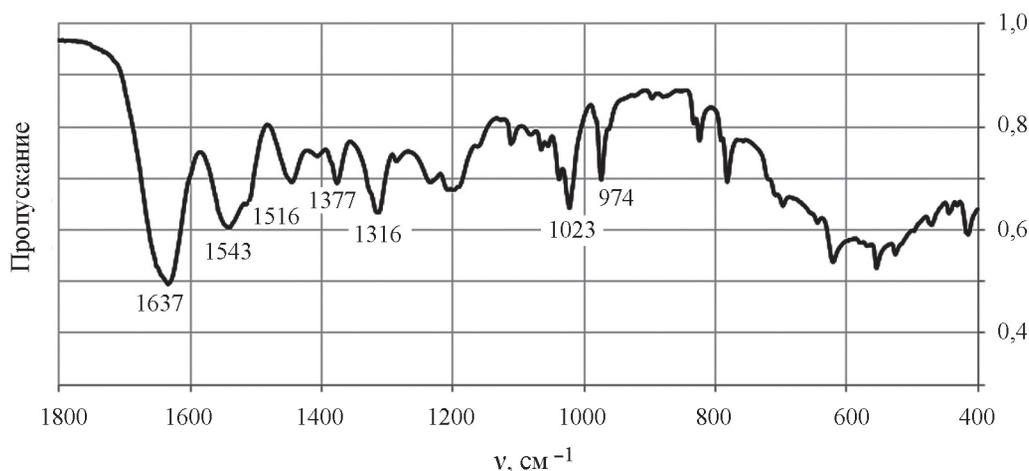


Рис. 2. ИК-спектры системы диоксидин / 1% желатин

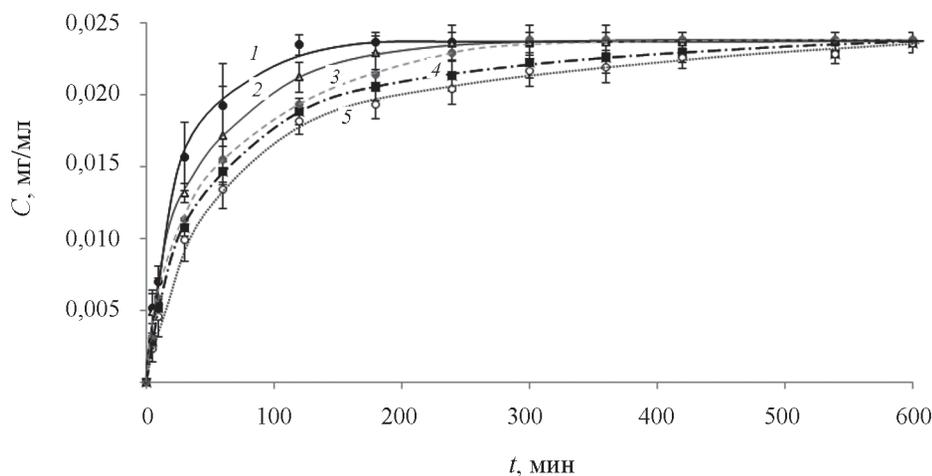


Рис. 3. Кинетические кривые высвобождения диоксида из систем диоксидин / желатин-30 (желатин в прекурсор, мас. %: 1 – 1, 2 – 2, 3 – 4, 4 – 8, 5 – 10)

Соотнесение основных полос ИК-спектра систем диоксидин / 1% желатин и ее индивидуальных компонентов (предшественников)

Структурный фрагмент	Диоксидин / желатин, см ⁻¹	Индивидуальный компонент, см ⁻¹	$\Delta \nu$, см ⁻¹
Диоксидин			
ОН (ν)	3299	3376; 3252	
СН (ν)	3077	3077	0
Диоксид хиноксалина (ν, ароматического кольца и группы N → O)	1516	1511	5
NO (ν)	1377	1372	5
С–O–Н	1316	1311	5
С–O–Н	1024	1022	2
NO	975	964	11
Желатин			
ОН (ν), NH ₂ (ν)	3299	3286	13
С=O (ν), (Амид 1)	1637	1625	12
N–H (δ), C–N (δ), (Амид 2)	1543	1524	19

ных электронов атома кислорода. Кинетические кривые высвобождения лекарственного вещества из систем диоксидин / желатин-30 приведены на рис. 3. Время высвобождения полного диоксида в зависимости от условий синтеза систем меняется от 3 до 10 ч. При увеличении содержания желатина в растворе-предшественнике, использованном при синтезе систем, время высвобождения диоксида сначала увеличивается и проходит через максимум в случае образца диоксидин / 8% желатин. Дальнейшее увеличение содержания полимера в матрице приводит к снижению времени его высвобождения. Замораживание матрицы при –196 °С способствует сокращению времени высвобождения лекарственного компонента (рис. 4). В этом случае время высвобождения лекарственного компонента растет с увеличением содержания желатина в растворе-предшественнике и достигает максимального значения (10 ч) в случае образца диоксидин / 10% желатин-196.

Согласно микрофотографиям СЭМ (рис. 5), системы диоксидин / желатин являются пористыми (диаметр пор от 100 до 20 000 нм). В случае образцов с низким содержанием желатина поры переходят одна в другую через поры меньшего размера. Их размер не превы-

шает 5000 нм. Увеличение концентрации желатина в растворе-предшественнике для систем диоксидин / желатин-30 приводит сначала к снижению среднего диаметра пор и увеличению толщины их стенок, а затем (в случае систем диоксидин / 10% желатин-30), наоборот, к увеличению диаметра пор до 20 000 нм. Вероятно, поэтому скорость высвобождения лекарственного компонента сначала снижается (с увеличением доли «мелких» пор), а потом увеличивается (по мере «укрупнения» пор). Замораживание при –196 °С растворов-предшественников позволяет получить при низком содержании лекарственного компонента более тонкостенные поры, высвобождение из которых за счет большей удельной поверхности происходит быстрее. С увеличением концентрации желатина растет толщина стенок пор, но их диаметр находится в диапазоне 100–5000 нм.

Антибактериальную активность полученных систем тестировали диско-диффузионным методом. Зоны задержки роста вокруг дисков для систем диоксидин / желатин-30 сначала плавно сокращались с увеличением содержания желатина, а затем (при 6%-й концентрации желатина-30) выходили на плато (рис. 6). В случае систем, при синтезе которых использовали заморозку жидким азотом, наблюдалась ана-

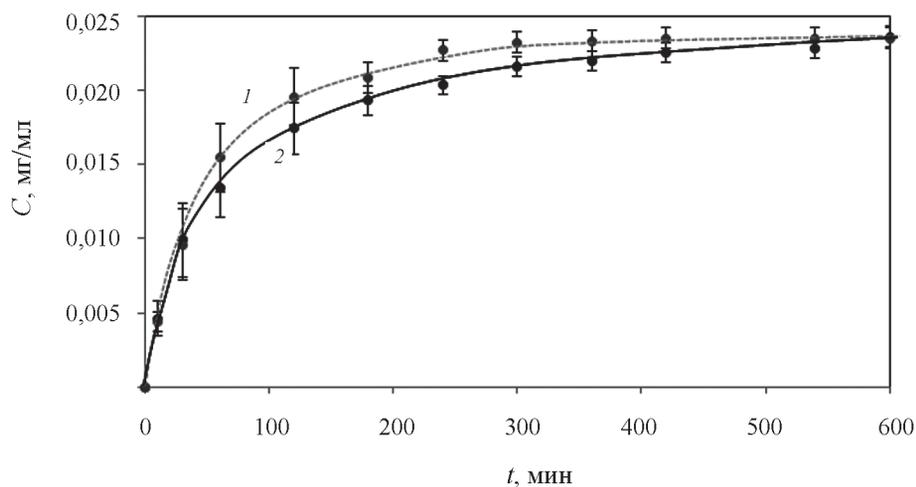


Рис. 4. Кинетические кривые высвобождения диосмина из систем диосмин / 8% желатин-196 (а) и диосмин / 8% желатин-30 (б)

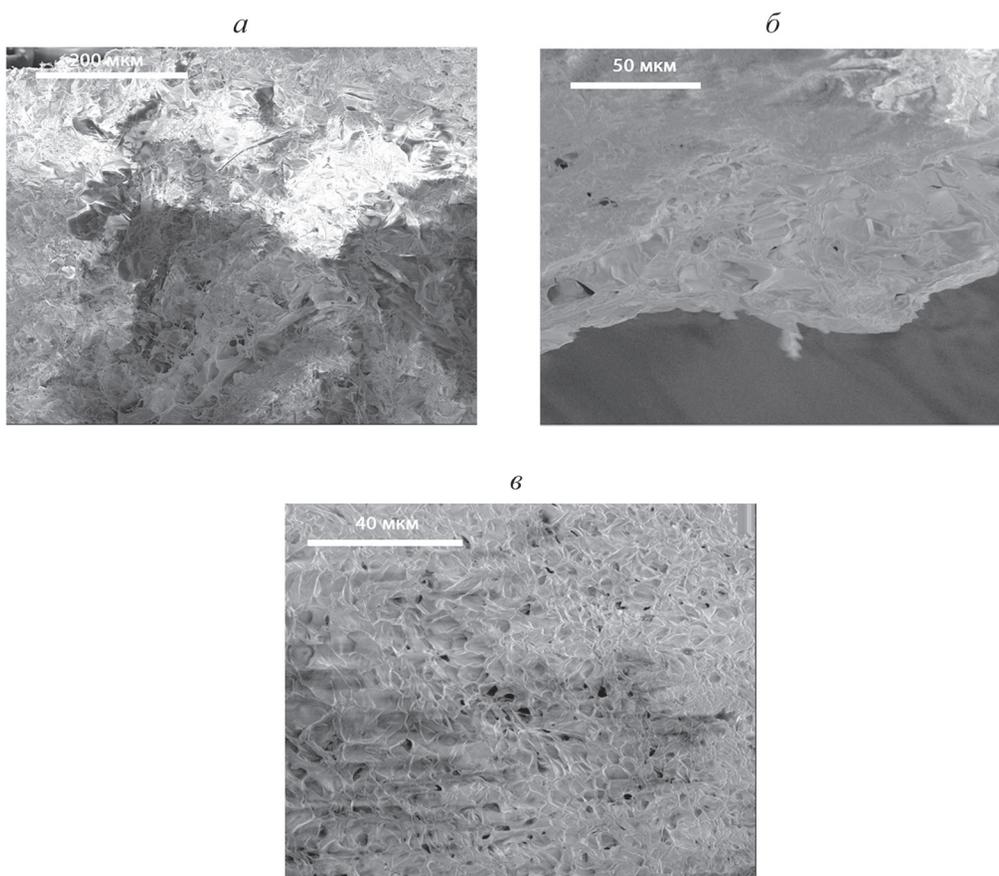


Рис. 5. Микрофотографии СЭМ образцов: диосмин / 1% желатин-30 (а), диосмин / 10% желатин-30 (б), диосмин / 10% желатин-196 (в)

логичная картина, величины ЗЗР образцов практически не зависели от условий заморозки матрицы и совпадали в пределах погрешности для образцов с равной концентрацией

желатина. Уменьшение среднего диаметра пор матриц и увеличение времени высвобождения активных компонентов приводит к сокращению ЗЗР бактериальных штаммов.

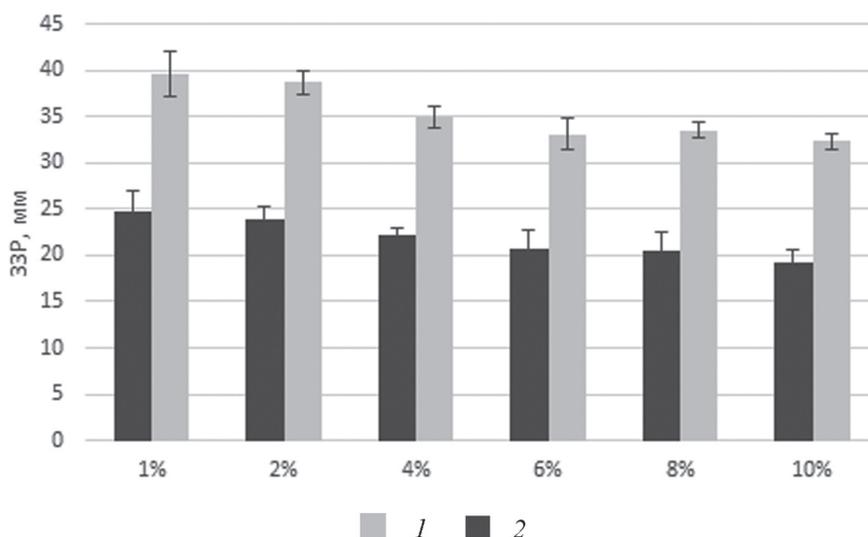


Рис. 6. ЗЗР бактериальных штаммов *E. coli* (1) и *S. aureus* (2) вокруг дисков систем диоксидин / желатин-30, полученных с использованием растворов предшественников с разной концентрацией желатина (1–10%)

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что варьирование условий криоформирования систем диоксидин / желатин по-

зволяет направленно изменять пористую структуру желатиновых матриц и время высвобождения из них активного компонента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun B., Yeo Y. // *Cur. Op. in S. St. and Mater. Sci.* 2012. Vol. 16. P. 295–301.
2. Heng P. // *Pharm. Devel. and Tech.* 2018. Vol. 23. P. 833.
3. Junyaprasert V.B., Morakul B. // *A. J. of Pharma. Sci.* 2015. Vol. 10. P. 13–23.
4. Shabatina T.I., Morosov Yu.N., Soloviev A.V., Shabatina A.V., Vernaya O.I., Melnikov M.Y. // *Nanomaterials.* 2021. Vol. 11. P. 1–17.
5. Keck C.M., Müller R.H. // *Eu. J. of Phar. and Biophar.* 2006. Vol. 62. P. 3–16.
6. Шабатина Т.И., Морозов Ю.Н., Соловьев А.В., Шабатин А.В., Верная О.И., Федоров В.В., Мельников М.Я. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* Т. 62. № 4. С. 297.
7. Pal K., Paulson A.T., Rousseau D. // *Modern Biopolymer Sci.* 2009. Vol. 16. P. 519–557.
8. Shabatina T.I., Vernaya O.I., Shabatina V.P., Evseeva I.V., Melnikov M.Ya., Fitch A.N., Chernyshev V.V. // *Crystals.* 2018. Vol. 8. P. 1–15.
9. Adeosun S., Ilomuanya M., Gbenebor O., Dada M., Odili C. // *Ad. Fun. Mater.* 2020. Vol. 68. P. 1–25.
10. Верная О.И., Хватов Д.И., Нуждина А.В., Федоров В.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Шабатина Т.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* Т. 58. № 5. С. 271.
11. Шабатина Т.И., Верная О.И., Нуждина А.В., Звукочка Н.Д., Семенов А.М., Шабатин В.П., Лозинский В.И., Мельников М.Я. // *Рос. Нанотех.* 2018. Т. 13. С. 76.
12. Lozinsky V.I., Shchekoltsova A.O., Sinitskaya E.S., Vernaya O.I., Nuzhdina A.V., Bakeeva I.V., Ezernitskaya M.G., Semenov A.M., Shabatina T.I., Melnikov M.Ya. // *I. J. of Bio. Macromol.* 2020. Vol. 160. P. 583–592.
13. Шабатина Т.И., Верная О.И., Нуждина А.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Мельников М.Я. // *ЖФХ.* 2019. Т. 93. С. 1556.
14. Шабатина Т.И., Верная О.И., Карлова Д.Л., Нуждина А.В., Шабатин В.П., Семенов А.М., Лозинский В.И., Мельников М.Я. // *Рос. Нанотех.* 2018. Т. 13. № 9. С. 92.
15. García-Astrain C., Guaresti O., González K., Santamaria-Echart A., Eceiza A., Corcuera M.A., Gabilondo N. // *Mater. Lett.* 2016. Vol. 182. P. 134–137.
16. Salahuddin B., Wang S., Sangian D., Aziz Sh., Gu Q. // *ACS Applied Bio Mater.* 2021. Vol. 4. P. 2886–2906.
17. Jaipan P., Nguyen A., Narayan R. // *J. MRS Com.* 2017. Vol. 7. P. 416–426.
18. Santoro M., Tatara A.M., Mikos A.G. // *J. of Cont. R.* 2014. Vol. 190. P. 210–218.

Информация об авторах

Верная Ольга Ивановна – ст. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент кафедры химии МГТУ им. Н.Э. Баумана, канд. хим. наук, olga_vernaya@mail.ru;

Шумилкин Алексей Сергеевич – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, alexpard99@gmail.com;

Карлова Дарья Львовна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, darya_karlova.98@mail.ru;

Семенов Александр Михайлович – вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук;

Шевченко Анна Сергеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;

Макеева Алина Алексеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;

Шабатин Андрей Владимирович – науч. сотр. ИФХиЭ им А.Н. Фрумкина, канд. физ-матем. наук, 5dr.on5@mail.ru; Шабатина Татьяна Игоревна – зав. лабораторией химии низких температур, вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор кафедры химии МГТУ имени Н.Э. Баумана, докт. хим. наук, доцент, tatyana-shabatina@yandex.ru;

Мельников Михаил Яковлевич – зав. кафедрой химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор, melnikov46@mail.ru.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.05.2022;
одобрена после рецензирования 12.09.2022;
принята к публикации 14.10.2022.