

УДК 615.03: 615.28: 615.036.8

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕХАНОХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ И СОРБИРОВАННЫХ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ЧАСТИЦАХ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ ФОРМ ЦЕФТАЗИДИМА НА ПРИМЕРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СЕПСИСА У МЫШЕЙ (CBA×C57BL/6)F₁, ИНДУЦИРОВАННОГО PSEUDOMONAS AERUGINOSA

¹Душкин А.В., ³Лыков А.П., ⁴Ларина О.Н., ²Гольдина И.А., ²Сафронова И.В.,
¹Гуськов С.А., ¹Евсеев В.И., ²Гайдун К.В., ¹Ляхов Н.З., ²Козлов В.А.

¹ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, e-mail: dushkin@solid.nsc.ru;

²НИИКИ СО РАМН, Новосибирск, e-mail: kgaidul@mail.ru;

³НИИ МББ СО РАМН, Новосибирск, e-mail: lykovalex@freemail.ru;

⁴ФГУ «Новосибирская межобластная ветеринарная лаборатория»,
Новосибирск, e-mail: o.larina.72@mail.ru

Проведено сравнительное исследование антимикробной активности официальной и механически модифицированных форм цефтазида, сорбированных на наноструктурированных частицах диоксида кремния при экспериментальном сепсисе, индуцированном *Pseudomonas aeruginosa*, у мышей (CBA×C57BL/6) F₁. Модификация цефтазида осуществлялась методом измельчения и формирования механокомпозигов из антибиотика и коллоидного диоксида кремния в шаровой мельнице, в различных массовых соотношениях антибиотика и диоксида кремния, с целью изменения его физико-химических свойств и терапевтической эффективности. Механохимическая обработка приводила к многократному увеличению массовой и количественной доли малоразмерных фракций частиц нано-SiO₂ и увеличению количества цефтазида, сорбированного наиболее биологически активными микро- и наноразмерными частицами. Модифицированный таким образом цефтазид обладал более высокой терапевтической эффективностью при лечении экспериментального сепсиса у мышей, одним из возможных механизмов которой являлось повышение функциональной активности клеток моноцитарно-макрофагальной системы.

Ключевые слова: сепсис, наночастицы диоксида кремния, механическое измельчение, цефтазид

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MECHANICALLY MODIFIED WITH SORPTION ON NANOSTRUCTURED PARTICLES OF SILICIUM DIOXIDE FORMS OF CEFTAZIDIME IN ANIMAL MODEL OF SEPSIS CAUSED BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN (CBA×C57BL/6) F₁ MICE

¹Dushkin A.V., ³Lykov A.P., ⁴Larina O.N., ²Goldina I.A., ²Safronova I.V., ¹Guskov S.A.,
¹Evseenko V.I., ²Gaidul K.V., ¹Lyakhov N.Z., ²Kozlov V.A.

¹Institute of Solid State chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk,
e-mail: dushkin@solid.nsc.ru;

²Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: kgaidul@mail.ru;

³Scientific Research Institute of molecular biology and biophysics SB RAMS,
Novosibirsk, e-mail: lykovalex@freemail.ru;

⁴FSI Novosibirsk's interregional veterinary laboratory, Novosibirsk, e-mail: o.larina.72@mail.ru

A comparative study of antimicrobial activity of officinal and mechanically modified forms of ceftazidime, adsorbed on the nanostructured particles of silica in experimental sepsis induced by *Pseudomonas aeruginosa* in (CBA×C57BL/6) F₁ mice has been conducted. The modification of ceftazidime was carried out by grinding and shaping of mechanocomposites of antibiotic and colloidal silicon dioxide mixture in a ball mill, in various mass ratios of the antibiotic and silicon dioxide, in order to change the physicochemical properties and therapeutic efficiency of the antibiotic. Mechanochemical treatment leads to a multiplex increasing of mass and quantitative proportion of low – sized fractions of nano – SiO₂ and increasing of the quantity of ceftazidime, adsorbed on the most biologically active micro- and nano – sized particles. This modification of the ceftazidime had a higher therapeutic efficacy, on the base of the parameters of survival rate, in the treatment of experimental sepsis in mice, one of the possible mechanisms of which is the increasing of the functional activity of monocytic – macrophage system's cells.

Keywords: sepsis, nanoparticles of silicium dioxide, mechanical breaking, ceftazidime

Проблема эффективной комплексной терапии инфекционных заболеваний относится к числу наиболее актуальных в современной медицине. Ведущая роль в этой терапии отводится антибактериальным

препаратам, адекватное применение которых определяет эффективность лечения [5]. Несмотря на мощный арсенал антибактериальных средств, количество гнойно-септических осложнений в различных обла-

стях хирургии остается высоким [6]. Одной из причин данных осложнений является формирование антибиотико-резистентных штаммов бактерий. В настоящее время *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), вызывающая нозокомиальные инфекции и, в частности, сепсис, при котором смертность стабильно высока [8], рассматривается как один из наиболее значимых микроорганизмов, характеризующихся высокой резистентностью к антибактериальным препаратам [5, 11].

В настоящее время твердофазная механохимическая технология получения композиций лекарственных препаратов с веществами-«носителями» продемонстрировала свою эффективность для повышения фармакологической активности и безопасности ряда лекарственных препаратов [1, 2, 7]. Так как антибиотикотерапия является одним из базовых компонентов интенсивной терапии сепсиса, создание новых соединений антибиотиков с широким антимикробным спектром, низкой токсичностью и высокой антибактериальной активностью на основе методов механохимии является актуальным.

Целью данного исследования было сравнительное изучение антимикробной активности различных форм цефтазидама – официальной и модифицированных механохимической обработкой, сопровождаемой сорбцией на наноструктурированных частицах диоксида кремния в различных соотношениях.

Материал и методы исследования

Цефтазидим, антибиотик группы цефалоспоринов III поколения, является препаратом выбора для лечения нозокомиального сепсиса, ассоциированного с *P. aeruginosa* [12].

Модификация цефтазидама осуществлялась путем механической обработки смеси антибиотика и коллоидного диоксида кремния (SiO_2) (энтеросорбент «Полисорб», Россия) в шаровой мельнице (энергонапряженность 1г) в массовых соотношениях антибиотик/ SiO_2 – 100:1; 75:1; 60:1; 50:1 и 30:1 [2], с целью формирования механокомпозиций и изменения физико-химических свойств антибиотика. Электронные микрофотографии наноструктурированного SiO_2 (нано – SiO_2) получали на электронных микроскопах JEOL HITACHI (Япония). Гранулометрический состав водных суспензий исходного диоксида кремния и его композиций с цефтазидимом определяли на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия). Концентрации водных растворов цефтазидама определялись методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 (США).

Для оценки степени сорбции навеску композиции антибиотик/диоксид кремния, рассчитанную для получения раствора с концентрацией цефтазидама 100 г/л, суспендировали в 5 см³ дистиллированной воды и центрифугировали в течение 30 мин при ско-

рости 12000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливали, осадок повторно суспендировали в таком же количестве дистиллированной воды. Концентрация антибиотика, десорбированного в водную фазу, определялась методом ВЭЖХ. Количество сорбированного антибиотика рассчитывалось из суммарного определения количества антибиотика, десорбированного из нано- SiO_2 . Было экспериментально определено, что более 95% сорбированного антибиотика удаётся «извлечь» уже за 2 цикла осаждения/суспендирования.

Биологические эксперименты проводили на мышах – самцах (СВА×С57В1/6)F₁, в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министрства здравоохранения СССР от 12.08. 1977 г. № 755). Для оценки терапевтической эффективности цефтазидама использовали модель экспериментального сепсиса у лабораторных животных, индуцированного *P. aeruginosa*.

Для индукции сепсиса мышам внутривенно вводили 24-часовую культуру *P. aeruginosa* ATCC № 27853 в объеме 0,5 мл ($5 \cdot 10^8$ КОЕ/мышь). Через 24 часа от момента индукции септического процесса, в течение 3 дней, ежедневно, внутривенно, однократно вводили контрольной группе животных – 0,9%-й раствор хлорида натрия, а опытным группам – по 2,5 мг/мышь (0,25 мл) раствора нативного цефтазидама или механокомпозиции из различных соотношений антибиотика и нано- SiO_2 . Все исследуемые группы состояли из 10 животных. Проведено 3 независимых эксперимента. Выживаемость мышей учитывали ежедневно, начиная со 2-х суток от момента индукции сепсиса, до 8 суток включительно. Влияние официальной и модифицированной формы цефтазидама (цефтазидим/нано- SiO_2 – 30:1) на фагоцитоз эритроцитов барана перитонеальными макрофагами, продукцию активных форм кислорода, уровень внеклеточного и внутриклеточного оксида азота (NO) *in vitro* исследовали в соответствии с методами [3, 4]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0. Результаты представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (Lq-Hq), достоверность различий рассчитывалась по χ^2 -критерию и U-критерию Манна–Уитни и принималась при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Структурные характеристики композиций. Использованный нами материал коллоидного аморфного диоксида кремния состоял из округлых наночастиц размером 20–100 нм, агрегированных в рыхлые агрегаты размером 5–100 мкм, что продемонстрировано на приведенных электронных микрофотографиях (рис. 1).

В водной среде агрегаты частично разрушались. При механохимическом получении композиций с цефтазидимом происходило дальнейшее уменьшение размеров агрегатов. Гистограммы и численные данные распределения по размерам частиц приведены на рис. 2 и в табл. 1.

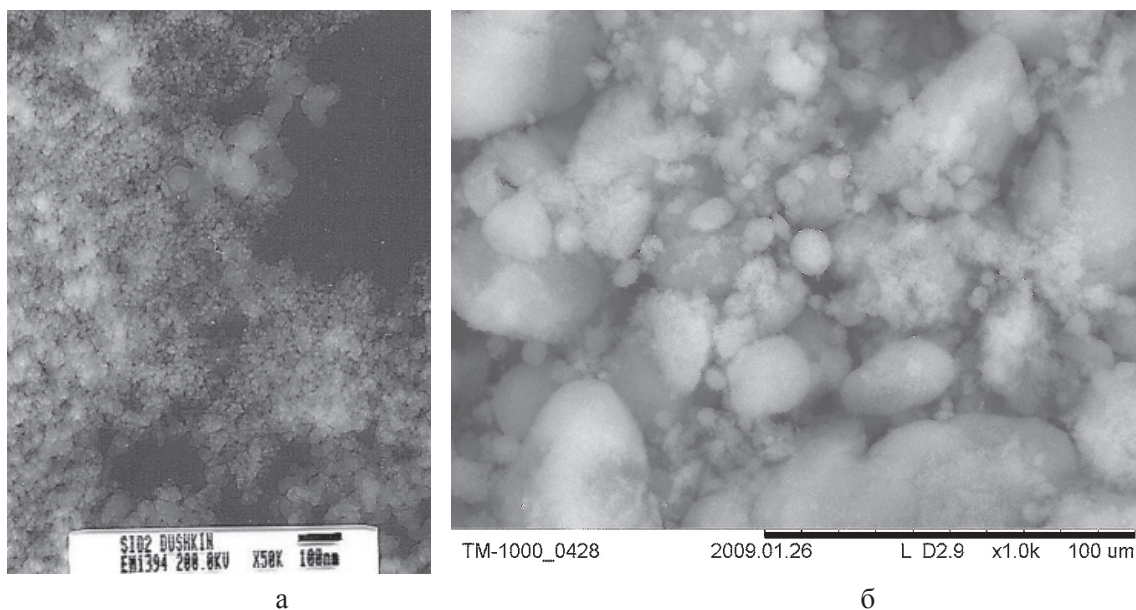


Рис. 1. Электронные микрофотографии коллоидного аморфного диоксида кремния при различном увеличении: а – наноразмерный диапазон; б – микроразмерный диапазон

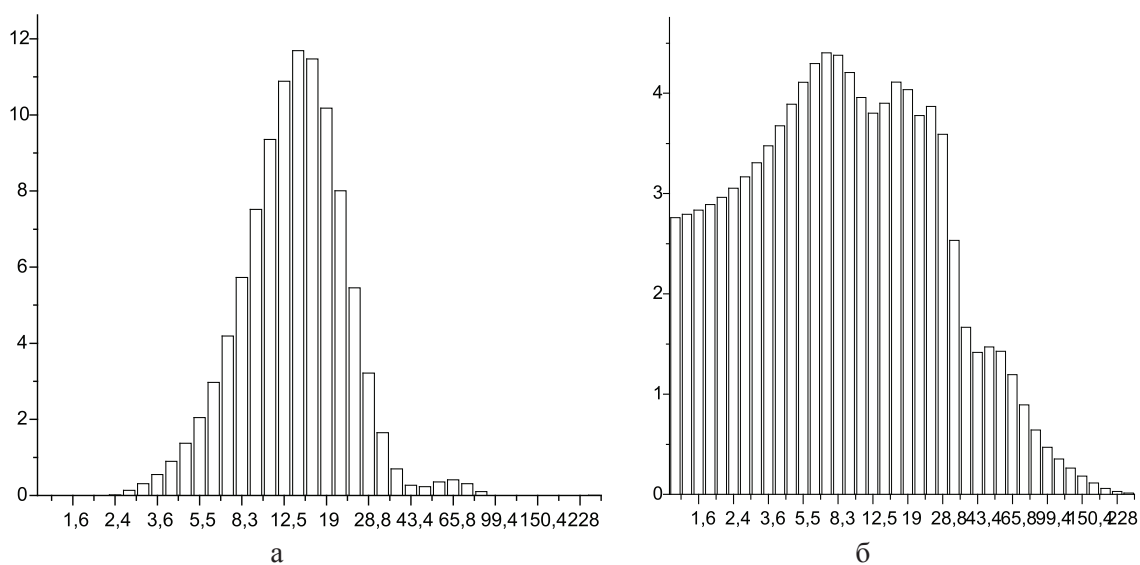


Рис. 2. Гистограммы распределения по размерам частиц (мкм) в водных суспензиях исходного коллоидного аморфного диоксида кремния (а) и его композиции с цефтазидимом в массовом соотношении цефтазидим/нано-SiO₂ = 30/1

Таблица 1

Данные гранулометрического состава полученных микрокомпозиционных материалов в весовых (объемных) процентах от расчетного

Состав, условия получения	%, < 3, МКМ	%, < 5, МКМ	%, < 10, МКМ
Коллоидный диоксид кремния исходный	0,5	5,3	25,7
Цефтазидим/коллоидный нано-SiO ₂ , 30/1 по весу, механическая активация в течение 2 часов	14,3	23,3	33,0
Цефтазидим/коллоидный нано-SiO ₂ , 30/1 по весу, механическая активация в течение 4 часов	23,8	38,9	56,2

Из полученных данных следует, что в композициях, полученных механохимически, удастся существенно увеличить массовую долю мелких (менее 3–5 мкм), потенциально наиболее биологически активных фракций частиц – носителей.

Иммобилизация антибиотика частицами диоксида кремния. Мы провели оценку количества цефтазида, сорбированного на нано-SiO₂. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Экспериментально определенная степень сорбции цефтазида на коллоидном диоксиде кремния в полученных композициях при массовом соотношении цефтазид/нано-SiO₂ = 30/1

Длительность механической обработки, часов	Количество сорбированного антибиотика, мг / количество нано-SiO ₂ , мг (вес. %)
Смесь без обработки	10,5 мг/16,7 мг(63%)
0,5	6,7 мг/16,7 мг(40%)
1	6,4 мг/16,7 мг(38%)
2	6,4 мг/16,7 мг(38%)
4	7,2 мг/16,7 мг(43%)

Из механохимически полученных композиций антибиотик/нано-SiO₂ образуются достаточно плотные осадки, тогда как при центрифугировании композиций, полученных простым смешиванием компонентов (без механохимической обработки), осадок SiO₂ становится гелеобразным и содержит большое количество водной фазы исходной суспензии – фактически, раствора антибиотика. Таким образом, оценка количества сорбированного антибиотика в «физических смесях» антибиотик – Полисорб имеет завышенное значение. В пределах точности экспериментов ($\pm 10\%$) количество сорбированного цефтазида не меняется, и это позволяет выбирать минимально возможное время механической обработки в пределах 0,5–2 часов. При увеличении массовых соотношений антибиотика в композициях, полученных механохимически, цефтазид/нано – SiO₂ от 10/1 до 40/1, степень сорбции незначительно увеличивается – от ~35% до ~40%, что позволяет считать их приблизительно одинаковыми. Такая относительно неизменная степень сорбции и легкость высвобождения сорбированного антибиотика, по нашему мнению, указывает на объемный механизм сорбции за счет эффекта мезопористости использованного материала SiO₂, то есть концентрационном накоплении антибиотика в порах частиц коллоидного диоксида кремния. Эта гипо-

теза позволяет предположить, что при увеличении массовых соотношений цефтазид/SiO₂ степень сорбции останется приблизительно постоянной.

Однако независимо от возможного механизма сорбции, механохимическая обработка позволяет многократно увеличить массовую (до ~50 раз) и соответственно количественную долю малоразмерных (менее 3–5 мкм) фракций частиц нано-SiO₂, и, тем самым, увеличить количество цефтазида, сорбированного наиболее биологически активными микро- и наноразмерными частицами.

Исследование терапевтической эффективности модифицированного цефтазида. В серии предварительных экспериментов была определена доза *P. aeruginosa*, составлявшая $5 \cdot 10^8$ КОЕ/мышь, которая приводила к 100% гибели мышей в течение периода наблюдения.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что на 8 сутки от момента индукции сепсиса в контрольной группе, получавшей физиологический раствор, все мыши погибли от сепсиса. В группе мышей, получавших нативный цефтазид, выживаемость животных составила 50%. В то же время среди групп мышей, которым вводили модифицированные формы цефтазида в виде механокомпозиата, выживаемость при сепсисе была различной при разных соотношениях антибиотика и нано-SiO₂. При соотношении цефтазид/нано-SiO₂, равном 50:1 отмечена 100%-я выживаемость мышей. По мере увеличения доли антибиотика и уменьшения доли нано-SiO₂ в механокомпозиате с 50:1 до 100:1 выявлено снижение выживаемости мышей к 8-м суткам эксперимента (рис. 3).

В то же время нано-SiO₂ не обладает собственными антибактериальными свойствами, о чем свидетельствуют данные литературы [10], а также снижение выживаемости животных при дальнейшем увеличении доли нано-SiO₂ до 30:1. При соотношениях антибиотик/нано-SiO₂ 60:1, 50:1 и 30:1 получены статистически значимые различия выживаемости между группами мышей, получавших лечение официальной формой цефтазида и модифицированными его формами.

Таким образом, сорбция цефтазида на наноструктурированном SiO₂ способствует увеличению терапевтической эффективности данного антибиотика при экспериментальном сепсисе, индуцированном *P. aeruginosa*.

Так как исход любого гнойно-септического процесса зависит не только от антибактериальной активности антимикробного

препарата, вирулентности и чувствительности к нему возбудителя заболевания, но и от способности макроорганизма противостоять инфекции, создание антибактериальных препаратов, обладающих способностью стимулировать противоинфекционную резистентность, является перспективным направлением фармакологии [6]. Способность nano-SiO_2 проникать внутрь клетки [9] позволяет предположить возможность фагоцитоза данных частиц клетками системы

моноклеарных фагоцитов, с последующей их активацией и продукцией неспецифических факторов защиты. Поэтому для оценки функционального состояния клеток моноцитарно/макрофагальной системы мы изучали воздействие модифицированного цефтазидима (цефтазидим/ nano-SiO_2 – 30:1) на уровень фагоцитоза и продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами мышей. Результаты трех независимых экспериментов представлены на рис. 4 и 5.

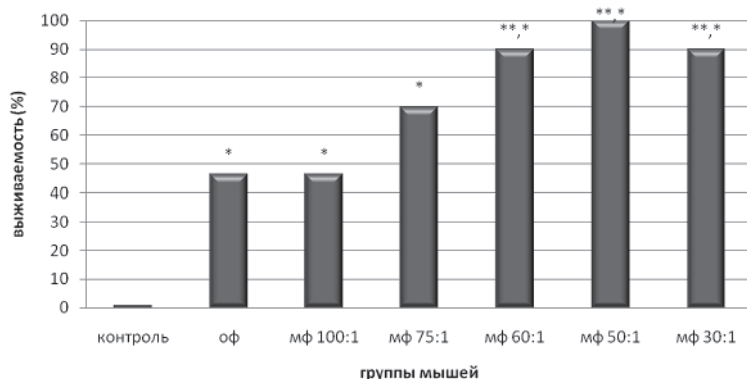


Рис. 3. Выживаемость мышей (СВА×С57В1/6)F₁ с экспериментальным сепсисом, индуцированным *P. aeruginosa*, на фоне лечения различными формами цефтазидима

Примечание: Оф – официальная форма цефтазидима; Мф – модифицированная форма цефтазидима; * – достоверность различий с контрольной группой; ** – достоверность различий между официальным и модифицированным препаратом

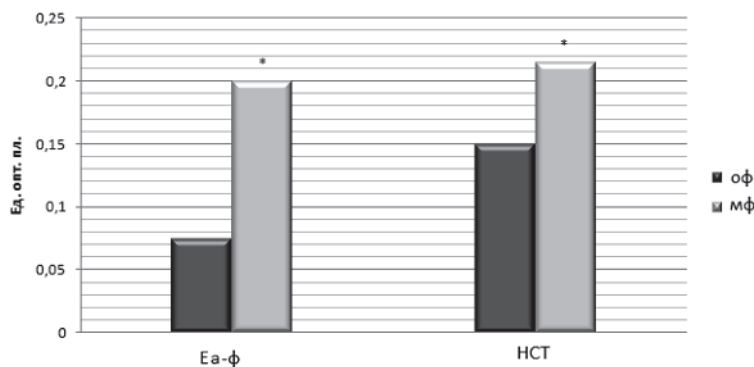


Рис. 4. Влияние различных форм цефтазидима на уровень фагоцитоза и продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами мышей *in vitro*

Примечание: Оф – официальная форма цефтазидима; Мф – модифицированная форма цефтазидима; * – достоверность различий между официальным и модифицированным препаратом

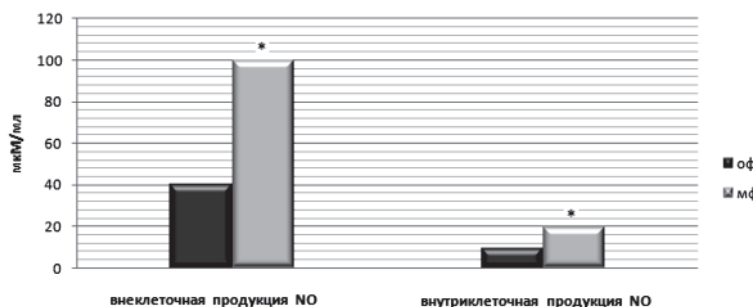


Рис. 5. Влияние различных форм цефтазидима на уровень внутриклеточной и внеклеточной продукции оксида азота перитонеальными макрофагами мышей *in vitro*

Примечание: Оф – официальная форма цефтазидима; Мф – модифицированная форма цефтазидима; * – достоверность различий между официальным и модифицированным препаратом

В результате проведенных экспериментов было выявлено увеличение внутриклеточной продукции NO и активных форм кислорода, а также более высокий уровень продукции NO во внеклеточное пространство и активация фагоцитоза перитонеальными макрофагами мышей под действием модифицированного цефтазида ($p < 0,05$). Следовательно, применение механохимически модифицированного цефтазида, сорбированного на наноструктурированном SiO₂, приводит к повышению функциональной активности моноцитов/макрофагов.

Заключение

В результате использования механохимической технологии получения композиций антибиотик/нано-SiO₂ происходит многократное увеличение доли наиболее биологически активных частиц нано-SiO₂ в механокомпозите, которые одновременно являются «носителями» активного антимикробного агента – цефтазида. При исследовании антимикробной активности механохимически модифицированного цефтазида, сорбированного на наночастицах диоксида кремния, на основании его терапевтической эффективности на модели экспериментального сепсиса, индуцированного *P. aeruginosa* у мышей, было установлено, что более высокая активность характерна для модифицированных форм антибиотика при соотношениях антибиотик/нано-SiO₂ 30:1 – 60:1. Одним из предполагаемых механизмов повышения антимикробной активности является поглощение моноцитами/макрофагами частиц нано-SiO₂ с сорбированным в них цефтазидом и увеличение функциональной активности этих клеток, что, наряду с прямым антимикробным действием антибиотика, способствует санации макроорганизма от инфекции.

Список литературы

1. Болдырев В.В. // Успехи химии. – 2006. – Т. 75. – С. 203–216.
2. Дущкин А.В. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2004. – Т. 12, №3. – С. 251–274.
3. Кондрашова Н.М., Плехова Н.Г., Заворуева Д.В. // Цитология. – 2010. – Т.52, №7. – С. 588–596.
4. Хитрук Н.М. Функциональная активность фагоцитов у больных с инфекциями, вызванными вирусом простого герпеса: автореф. дис. ... – М., 2007.
5. Лазарева И.В., Игонин А.А. // Лечащий врач. – 2004. – № 4. – С. 11–14.
6. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии. – М.: Бионика, 2003.
7. Dushkin A.V. Mechanochemical synthesis of organic compounds and rapidly soluble materials: in High-energy

ball milling. Mechanochemical processing of nanopowders. Woodhead Publishing Limited. – Oxford, 2010. – P. 249–273.

8. Lodise T.P., Patel N., Kwa A. Predictors of 30 – day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 2007. – Vol. 51. – P. 3510–3515.
9. Park E.J., Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro // *Toxicology Letters*. – 2009. – Vol. 184. – P. 18–25.
10. Radin S., Ducheyne P., Kamplain T., Tan B.H. Silica sol – gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release // *J. Mater. Res.* – 2001. – Vol. 57. – P. 313–320.
11. Witkauskiene A., Shrodeniene E. Dambrauskiene A. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality // *Medicina (Kaunas)*. – 2010. – Vol. 46. – P. 490–495.
12. Young L.S. Ceftazidime in the treatment of nosocomial sepsis // *The Amer. J. Medicine*. – 1985. – Vol. 79. – P. 89–95.

References

1. Boldyrev V.V. *Uspekhi khimii*, 2006, T.75, pp. 203–216.
2. Dushkin A.V. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2004, T.12, no3, pp. 251–274.
3. Kondrashova N.M. Plekhova N.G., Zavorueva D.V. *Tsitologiya*, 2010, T.52, no. 7, pp. 588–596.
4. Khitruk N.M. *Funktsionalnaya aktivnost fagocytov u bolnykh s infektsiyami, vyzbannymi virusom prostogo herpesa*. Avtoreferat k. M. N., Moskva, 2007, 28 p.
5. Lazareva I.B., Igonin A.A. *Lechiaschiy vrach*, 2004, no. 4, pp. 11–14.
6. Sidorenko S.V., Yakovlev S.V. *Infektsii v intensivnoy terapii*. Moskva, Bionika, 2003, 208 p.
7. Dushkin A.V. *Mechanochemical synthesis of organic compounds and rapidly soluble materials: in High-energy ball milling*. Mechanochemical processing of nanopowders. Woodhead Publishing Limited, Oxford, 2010, pp. 249–273.
8. Lodise T.P., Patel N., Kwa A. *Predictors of 30-day mortality among patients with Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection*. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 2007, Vol. 51, pp. 3510–3515.
9. Park E.J., Park K. *Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro*. *Toxicology Letters*, 2009, Vol. 184, pp. 18–25.
10. Radin S., Ducheyne P., Kamplain T., Tan B.H. *Silica sol – gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release*. *J. Mater. Res.*, 2001, Vol. 57, pp. 313–320.
11. Witkauskiene A., Shrodeniene E., Dambrauskiene A. *Pseudomonas aeruginosa bacteriemia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality*. *Medicina (Kaunas)*, 2010, Vol. 46, pp. 490–495.
12. Young L.S. *Ceftazidime in the treatment of nosocomial sepsis*. *The Amer. J. Medicine*, 1985, Vol. 79, pp. 89–95.

Рецензенты:

Павлов В.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. отделением эндопротезирования и эндоскопической хирургии суставов ФГУ «Новосибирский НИИТО» Росздравоцразвития, г. Новосибирск.

Смагин А.А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией лимфодетоксикации НИИКЭЛ СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 26.01.2012.