

УДК 615.03: 615.28: 615.036.8

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕХАНИЧЕСКИМ ИЗМЕЛЬЧЕНИЕМ С СОРБЦИЕЙ НА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ЧАСТИЦАХ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

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

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

<sup>2</sup>НИИКИ СО РАМН, Новосибирск, e-mail: kgaidul@mail.ru;

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

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

Проведен скрининг антимикробной активности антибиотиков группы цефалоспоринов, механически модифицированных с сорбцией на наноструктурированных частицах коллоидного диоксида кремния, на основании динамики роста *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, in vitro. Показана эффективность использования данной модификации антибиотиков для повышения их антибактериальной активности.

**Ключевые слова:** антимикробная активность, наночастицы, коллоидный диоксид кремния, механическое измельчение, антибиотики

## THE COMPARATIVE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CEPHALOSPORINE ANTIBIOTICS, MODIFIED BY MECHANICAL BREAKING WITH SORPTION ON NANOSTRUCTURED PARTICLES OF SILICON DIOXIDE

<sup>1</sup>Dushkin A.V., <sup>3</sup>Lykov A.P., <sup>4</sup>Larina O.N., <sup>1</sup>Gus'kov S.A., <sup>1</sup>Evseenko V.I., <sup>2</sup>Goldina I.A.,  
<sup>2</sup>Safronova I.V., <sup>2</sup>Gaidul K.V., <sup>1</sup>Lyakhov N.Z., <sup>2</sup>Kozlov V.A.

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

<sup>2</sup>Scientific Research Institute of clinical immunology SB RAMS, Novosibirsk, e-mail: kgaidul@mail.ru;

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

<sup>4</sup>FSI «Novosibirsk's interregional veterinary laboratory», Novosibirsk, e-mail: o.larina.72.@mail.ru

It has been studied the antimicrobial activity of cephalosporine antibiotics, mechanically modified with sorption on nanostructured particles of colloidal silicon dioxide on the base of growth dynamics of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* in vitro. The effectiveness of using of these modifications of antibiotics for the enhancement of their antibacterial activity has been shown.

**Keywords:** antimicrobial activity, nanoparticles, colloidal silicon dioxide, mechanical breaking, antibiotics

В основе эффективного лечебного действия антибактериальных препаратов лежат высокая чувствительность к ним возбудителей заболеваний, возможность создания терапевтически значимой концентрации антибиотика в очаге поражения, минимальное побочное действие на организм больного. В настоящее время общепризнанным является увеличение количества штаммов микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, а также нарастание патогенных свойств сапрофитных и потенциально патогенных микроорганизмов, что определяет необходимость создания новых, более эффективных антибактериальных препаратов [1]. Поиск путей преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам является актуальной задачей современной фармакологии. Одним из возможных решений данной проблемы

является наделение существующих антибиотиков новыми физико-химическими свойствами, различными методами модификации [2]. Развиваемая в ИХТТМ СО РАН, твердофазная, не требующая участия жидких фаз, механохимическая технология получения супрамолекулярных систем лекарственных веществ с веществами – «носителями» продемонстрировала свою эффективность для повышения их фармакологической активности и безопасности [3, 7]. Диоксид кремния (SiO<sub>2</sub>) рассматривается как перспективный биосовместимый, биodeградируемый материал – «носитель», не обладающий цитотоксичностью, способный пенетрировать через мембраны различных клеток, для создания на его основе лекарственных препаратов с контролируемым тканеспецифическим или интрацеллюлярным высвобождением [10].

**Целью** данного исследования являлась сравнительная оценка антибактериальной активности цефалоспоринов, модифицированных механохимической обработкой смесей антибиотик/ $\text{SiO}_2$ , сопровождающейся иммобилизацией антибиотика на наноструктурированных частицах  $\text{SiO}_2$ , с их официальными формами *in vitro*.

#### Материал и методы исследования

Модификация цефалоспориновых антибиотков III–IV поколения – цефтазидима, цефотаксима, цефепима, цефтриаксона, осуществлялась механической обработкой смесей антибиотиков и коллоидного диоксида кремния (энтеросорбент «Полисорб» (ЗАО «Полисорб», Россия)) в шаровой мельнице (энергонапряженность 1g) в массовых соотношениях антибиотик/ $\text{SiO}_2$  – 30:1. Гранулометрический состав водных суспензий исходного наноструктурированного  $\text{SiO}_2$  (нано- $\text{SiO}_2$ ) и его композиций с антибиотиками определяли на лазерном гранулометре Micro-Sizer 201 (Россия). Концентрации водных растворов антибиотиков исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1200 (США). Степень сорбции антибиотика коллоидным диоксидом кремния оценивали по количеству антибиотика, десорбировавшегося в водную фазу из  $\text{SiO}_2$ , осажденного центрифугированием водных суспензий механохимически полученных композиций.

Изучение антимикробной активности антибиотиков производилось *in vitro*, на основании динамики роста культуры ряда грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Определение минимальной ингибирующей дозы (МИК) проводилось методом двукратных серийных разведений. Антибактериальную активность антибиотиков оценивали в диапазоне концентраций от 0,03 до 128 мкг/мл. Препараты предварительно разводили в физиологическом растворе хлорида натрия. Тестирование роста бактерий осуществляли в 5 мл каждого разведения антибиотика с конечной концентрацией микроорганизмов  $5 \cdot 10^5$  микробных тел/мл. В соответствии с рекомендациями [4] контроль роста в присутствии растворителя не производился. В качестве контроля роста бактерий в МПБ использовали образцы, содержащие среду и тестируемые штаммы без антибиотиков. Культуры помещали в термостат на 24 часа при 37 °С, после чего учитывали наличие или отсутствие роста микроорганизмов и определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), то есть наименьшую концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост бактерий. Использовали следующие контрольные штаммы микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC № 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC № 25923, *Escherichia coli* ATCC № 25922, полученных из ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). Данные представляли в виде медианы (Me), границ нижнего и верхнего квартиля (Lq-Hq), достоверность различий рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни и принималась при значениях  $p < 0,05$ .

#### Результаты исследования и их обсуждение

*Структурные характеристики полученных композиций.*

Использованный нами материал коллоидного аморфного диоксида кремния, согласно электронно-микроскопическим исследованиям, состоял из округлых наночастиц размером 20–100 нм, агрегированных в рыхлые агрегаты размером 5–100 мкм. В водной среде агрегаты частично разрушались, образуя суспензию с частицами нано- $\text{SiO}_2$  размером 5–20 мкм. При механохимическом получении композиций с антибиотиками происходило дальнейшее уменьшение размеров агрегатов, то есть в механохимически полученных композициях удавалось существенно (приблизительно в 50 раз, до 36 вес. %) увеличить массовую долю мелких (менее 3–5 мкм), потенциально наиболее биологически активных фракций частиц – носителей.

*Иммобилизация антибиотиков частицами диоксида кремния.*

Мы провели оценку количества антибиотиков, сорбированных на наноструктурированных частицах коллоидного диоксида кремния. Экспериментально определенная степень сорбции исследованных антибиотиков, определяемая как отношение массы антибиотика к массе нано- $\text{SiO}_2$  в полученных композициях, при массовом соотношении антибиотик/нано- $\text{SiO}_2$  = 30/1, колеблется в пределах 35–45 вес. %. Учитывая неточность примененного метода ( $\pm 15\%$ ), степень сорбции была условно одинакова для всех антибиотиков. Такая относительно неизменная степень сорбции и легкость высвобождения сорбированного антибиотика, по нашему мнению, указывает на объемный механизм сорбции за счет эффекта мезопористости использованного материала нано- $\text{SiO}_2$ , то есть концентрационном накоплении антибиотика в порах частиц коллоидного диоксида кремния.

Следовательно, независимо от возможного механизма сорбции, механохимическая обработка композиций позволяет многократно увеличить массовую и, соответственно, количественную долю мало-размерных фракций частиц нано- $\text{SiO}_2$  и, тем самым, увеличить количество молекул антибиотиков, сорбированных наиболее биологически активными микро- и наноразмерными частицами, проникающими в бактериальные клетки.

*Изучение антибактериальной активности.*

Результаты двух независимых экспериментов по исследованию антибактериальной активности официальных и модифицированных форм цефалоспоринов при серийных разведениях в МПБ представлены в таблице.

Уровни минимальной ингибирующей концентрации официальных и модифицированных форм цефалоспориновых антибиотиков в тесте серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (Me (25; 75%))

Штамм микроорганизмов	Цефтазидим		Цефотаксим		Цефепим		Цефтриаксон	
	О.ф. – (1), <i>n</i> = 4	М.ф. (2), <i>n</i> = 4	О.ф. – (1), <i>n</i> = 4	М.ф. (2), <i>n</i> = 4	О.ф. – (1), <i>n</i> = 4	М.ф. (2), <i>n</i> = 4	О.ф. – (1), <i>n</i> = 4	М.ф. (2), <i>n</i> = 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	32,0 (32,0–32,0)	8,0 (8,0–8,0)*	4,0 (4,0–4,0)	0,5 (0,5–0,5)*	4,0 (4,0–4,0)	4,0 (4,0–4,0)	4,0 (4,0–4,0)	4,0 (4,0–4,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16,0 (16,0–16,0)	4,0 (4,0–4,0)*	4,0 (4,0–4,0)	4,0 (4,0–4,0)	16,0 (16,0–16,0)	1,0 (1,0–1,0)*	4,0 (4,0–4,0)	0,5 (0,5–0,5)*
<i>Escherichia coli</i>	16,0 (16,0–16,0)	4,0 (4,0–4,0)*	4,0 (4,0–4,0)	4,0 (4,0–4,0)	16,0 (16,0–16,0)	1,0 (1,0–1,0)*	4,0 (4,0–4,0)	0,5 (0,5–0,5)*

Примечание: О.ф. – официальная форма антибиотика, М.ф. – модифицированная форма антибиотика; \* – достоверность различий между формами антибиотика ( $p < 0,05$ ).

При исследовании динамики роста *Staphylococcus aureus* выявлено статистически значимое различие в концентрации, вызывающей задержку роста в тесте серийных разведений антибиотиков в МПБ для цефтазидима и цефотаксима. МИК модифицированных форм цефтазидима и цефотаксима была меньше, чем при использовании официальных форм данных антибиотиков. При изучении МИК для *Pseudomonas aeruginosa* было обнаружено, что модифицированный цефтазидим, цефепим и цефтриаксон подавляли рост микроорганизма в статистически значимо более низких концентрациях, по сравнению с официальными формами.

Изучение МИК модифицированных форм антибиотиков в отношении *Escherichia coli* показало, что концентрация цефтазидима, цефепима и цефтриаксона, по сравнению с их официальными формами, была меньшей ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, модифицированный цефтазидим обладал более выраженной антимикробной активностью в отношении всех трех штаммов изученных микроорганизмов. Модифицированная форма цефепима и цефтриаксона характеризовалась большей антимикробной активностью, по сравнению с официальной, в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. Модифицированный цефотаксим был более активен в подавлении видимого роста *Staphylococcus aureus*.

Полученные нами результаты исследования антимикробной активности антибиотиков, модифицированных механическим измельчением с сорбцией на  $\text{nano-SiO}_2$ , согласуются с представленными в литературе данными о большей эффективности гентамицина, конъюгированного с наночастицами биодegradуемой золь-гелиевой тетраэтилортосилики [9]. Сообщается так-

же о повышении антибактериальной активности антибиотиков, конъюгированных с наночастицами серебра и золота [5, 8]. Так, наночастицы золота, покрытые цефалоспориновым антибиотиком II поколения – цефаклором, обладают более высокой антимикробной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, по сравнению с нативным цефаклором, причем антимикробная активность обусловлена сочетанным действием входящих в этот комплекс исходных веществ. Антибиотик, ингибирует синтез пептидогликанов, а наночастицы золота формируют поры в клеточной стенке бактерий, что в конечном итоге приводит к гибели микроорганизмов [8]. На примере комплекса из хитозана с наночастицами золота и ампициллина было показано, что данная композиция обладает в 2 раза большей антимикробной активностью, по сравнению с официальной формой данного антибиотика [6].

### Заключение

В результате применения механохимической технологии получения композиций антибиотик/нано- $\text{SiO}_2$  происходит многократное увеличение доли наиболее биологически активных частиц  $\text{nano-SiO}_2$ , которые являются «носителями» антибиотика, что приводит к увеличению антибактериальной активности полученных композиций, на основании уменьшения минимальной ингибирующей концентрации роста микроорганизмов *in vitro*. Таким образом, модификация антибиотиков группы цефалоспоринов – цефтазидима, цефепима, цефотаксима, цефтриаксона, методом механохимической обработки их смесей с коллоидным диоксидом кремния является перспективным методом повышения их антибактериальной активности.

**Список литературы**

1. Богомолова Н.С. Перспективы использования нового цефалоспоринового антибиотика четвертого поколения в хирургии / Н.С. Богомолова, Т.Д. Орешкина, Л.В. Большаков // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 7. – С. 7–11.
2. Гайдунь К.В. Сравнительное исследование иммуноактивных и антибактериальных свойств нативного и механически модифицированного цефотаксима // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2/1. – С. 202–203.
3. Душкин А.В. Возможности механохимической технологии органического синтеза и получения новых материалов // Химия в интересах устойчивого развития. – 2004. – Т.12, №3. – С. 251–274.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – МУК 4.2.1890-04. – 91 с.
5. Орлов Д.С. Действие комплексов природных антимикробных пептидов и наночастиц серебра на микроорганизмы // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т.9, № 2. – С. 32–36.
6. Chamundeeswari M. Preparation, characterization and evaluation of a biopolymeric gold nanocomposite with antimicrobial activity // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2010. – Vol. 55. – P. 29–35.
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. Rai A. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. / A. Rai, A. Prabhune, C.C. Perry // J. Mater. Chem. – 2010. – Vol. 20. – P. 6789–6798.
9. Seleem M. N. Silica-Antibiotic hybrid nanoparticles for targeting intracellular pathogens // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2009. – P. 4270–4274.
10. Slowing I.I. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2008. – Vol. 60. – P. 1278–1288.

**Рецензенты:**

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

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

Работа поступила в редакцию 20.05.2011.