

УДК 615.46.47:678.046.76

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОЛОКНИСТЫХ ТКАНЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫМ КОМПЛЕКСОМ АНТИБИОТИКА ГЕНТАМИЦИНА

© 2009 г. М. В. Соловский*, В. И. Дубкова**, Н. П. Крутько**, Е. Ф. Панарин*,
М. Ю. Смирнова*, Н. А. Беясова***, О. И. Маевская**

*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004
e-mail: lab.2@mail.ru

**Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220072
e-mail: dubkova@igic.bas-net.by

***Белорусский государственный технологический университет, Минск, 220030
e-mail: n195404@tut.by

Поступила в редакцию 18.03.2008 г.

Для придания углеволокнистым тканям антимикробной активности модифицированные и немодифицированные углеволокнистые тканевые подложки обрабатывали растворами полимерного комплекса гентамицина, обладающего высокой антимикробной активностью и низкой токсичностью. Установлено, что антимикробная активность модифицированных углеволокнистых тканей зависит как от типа использованного материала-подложки, так и условий иммобилизации. Наиболее высоким антимикробным действием характеризуется образец модифицированной ткани, в котором в качестве материала-подложки был использован фосфорсодержащий углеволокнистый ионит в солевой форме.

В последнее время широкое развитие приобрели работы по изучению и использованию в медицине волокнистых угольных материалов (волокна, ткани) с очень высокой сорбционной способностью, полученных в Институте общей и неорганической химии Академии наук Беларуси путем карбонизации и последующего активирования гидратцеллюлозного сырья [1–3]. Карбонизованный фосфат целлюлозы – рентгеноаморфный ионит, содержащий слабо- и сильнокислотные группы, обладает высокой пористостью, развитой удельной поверхностью, нетоксичностью, биосовместимостью. Рекомендован к применению в медицине как самостоятельно (гемо- и энтеросорбенты), так и в виде углеволокнистого наполнителя полимерных композиционных материалов, предназначенных для проведения реконструктивно-восстановительных операций в хирургии [4, 5]. Существенный интерес в части применения волокнистых углеродных материалов (ВУМ) в хирургии, представляет разработка производных ВУМ, содержащих химически связанные антимикробные вещества. Такие углеродные волокнистые материалы, как и другие антимикробные волокна, обладающие бактерицидной активностью [6], могут быть использованы как для борьбы с первичными бактериальными инфекциями, так и с госпитальной микробной инфекцией.

Цель работы – модифицирование волокнистого углеродного материала путем иммобилизации его

водорастворимым антимикробным полимером (АП); исследование антимикробных свойств АП и модифицированного им материала; выявление наиболее активного антимикробного углеволокнистого материала.

МЕТОДИКА

Материалы. Использовали в качестве материалов-подложек 4 образца: образец 1 – немодифицированную целлюлозную батистовую белую ткань, образец 2 – немодифицированную углеродную ткань, образец 3 – фосфорсодержащую углеродную ткань с поверхностными кислотными группами, образец 4 – фосфорсодержащую углеродную ткань в солевой форме.

Антимикробный полимер. Синтезировали полимерный комплекс антибиотика – аминогликозида II поколения гентамицина, продуцируемого *Micromonospora purpurea* [7]. Гентамицин обладает высоким уровнем и широким спектром антимикробного действия, включающим *Pseudomonas aeruginosa*, и эффективно используется в современной терапии бактериальных инфекций [8]. На предварительном этапе работы сульфат гентамицина (СГ) переводили в гентамицин–основание (ГО), пропуская раствор СГ через колонку, заполненную анионитом ЭДЭ–10 П в ОН–форме. Полимером–носителем ГО служил водорастворимый, биосовместимый с живым организмом сополимер N-(2-гидроксипропил)метакрилами-

Таблица 1. Антимикробная активность (мкг/мл) ГО и его полимерного комплекса (метод серийных разведений)

Содержание ГО, %	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	МБСК	МБЦК	МБСК	МБЦК
100	0.06	0.12	0.12	0.50
25 (полимерный комплекс)	0.12	0.12	0.12	0.25

МБСК – минимальная бактериостатическая концентрация.
МБЦК – минимальная бактерицидная концентрация.
Микробная нагрузка составляла 5×10^5 кл./мл.

Таблица 2. Антибактериальная активность полимерного комплекса ГО (метод диффузии в агар)

Тест-культура	Зона подавления роста*, мм			
	концентрация препарата, мг/мл			
	10	7.5	5.0	2.5
<i>S. aureus</i>	13	12	12	12
<i>P. aeruginosa</i>	15	13	11	10
<i>E. coli</i>	17	16	15	12

* Зона бактерицидности (мм), превышающая 4 мм, считается эффективной.

Таблица 3. Бактерицидное действие растворов полимерного комплекса ГО на *S. aureus*

Препарат в изотоническом растворе, %	Концентрация клеток, КОЕ/мл		Фактор редукции, кл./мл
	исходная	после действия препарата	
0.50	5.1×10^7	6.0×10^0	6.93
0.25	6.4×10^7	1.2×10^1	6.73
0.15	6.8×10^7	4.1×10^1	6.22
0.06	7.2×10^7	8.6×10^1	5.93
0.03	6.2×10^7	1.2×10^2	5.70
0.01	7.4×10^7	2.7×10^3	4.44

да (ГПМА) с акриловой кислотой (АК). Данный сополимер, полученный по способу [9], содержал 22.8 мол. % звеньев АК и его молекулярная масса составляла 20 кДа. Комплексообразование сополимера ГПМА-АК с ГО в водном растворе при массовом соотношении антибиотик-полимер, равном 1 : 3, приводило по данным спектроскопии протонного магнитного резонанса (ПМР) и равновесного диа-

лиза к образованию стабильного полимерного комплекса гентамицина [9]. Содержание антибиотика в комплексе, определенное методом титрования аминогрупп ГО тринитробензолсульфокислотой [10], составило 25.7%. Полученный полимерный комплекс ГО по значениям LD₅₀ (внутривенное введение белым мышам) был существенно (в 12 раз) менее токсичен, чем немодифицированный полимером гентамицина сульфат [11].

Иммобилизация полимерного комплекса ГО. Иммобилизацию полученного полимерного комплекса ГО на тканевую подложку проводили по методу адсорбции из растворов антимикробного полимера разной концентрации (0.06 – 0.5%). При этом происходил частичный переход гентамицин-основания с полимера-носителя на тканевую подложку и закрепление антимикробного полимера в структуре материала-субстрата. В результате модифицированные таким образом ткани приобретали антимикробную активность. Иммобилизованные и высушенные ткани исследовали в двух вариантах: без нагрева и с нагревом.

Антимикробная активность полимерного комплекса ГО. Антимикробную активность полимерного комплекса ГО исследовали методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (мясо-пептонный бульон) и методом диффузии в агар [12]. Кроме того, бактерицидную активность антимикробного полимера оценивали в количественном суспензионном тесте. Для этого взвесь клеток *Staphylococcus aureus* выдерживали в течение 15 мин в растворах АП с концентрациями (0.01–0.5%) в изотоническом растворе. При высеве полученных суспензий на плотную среду определяли концентрацию сохранивших жизнеспособность клеток. Фактор подавления определяли как логарифм концентрации микробных клеток, утративших жизнеспособность при воздействии антимикробного полимера.

Степень антибактериальной активности пропианных растворами АП тканей определяли методом диффузии в агар. Для этого из образцов тканей вырезали диски диаметром 10 мм, которые помещали на свежесезаженные газоны бактериальных тест-культур на плотной агаризованной среде. Посевы инкубировали при 37°C в течение 1 сут, после чего определяли ширину зон ингибирования роста бактерий вокруг дисков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробная активность полимерного комплекса ГО. Важным результатом работы явилось изучение антимикробных свойств полимерного комплекса ГО. В табл. 1 представлены значения минимальных бактериостатических (МБСК) и бакте-

Таблица 4. Диаметры зон ингибирования роста тест-культур вокруг дисков из образцов углеродно-волоконистой ткани с иммобилизованным антимицробным полимером (АП)

Тест-культура	Образец ткани	Диаметры зон ингибирования, мм							
		концентрация АП при иммобилизации, %							
		0.5		0.25		0.125		0.06	
<i>S. aureus</i>	1	6*	6**	6*	6**	4*	5**	3*	3**
	2	8	9	7	7	4	7	2	3
	3	8	9	7	7	5	7	3	4
	4	9	10	8	9	7	9	4	5
<i>P. aeruginosa</i>	1	7	7	7	7	5	5	3	4
	2	7	8	5	8	5	7	3	4
	3	7	8	5	8	5	5	2	3
	4	10	11	9	10	8	9	6	8
<i>E. coli</i>	1	7	7	6	6	5	6	4	5
	2	10	10	6	7	5	6	5	6
	3	10	11	8	9	8	9	6	7
	4	12	14	10	12	10	11	8	9

* Без нагрева материала.

** С нагревом материала.

рицидных концентраций (МБЦК) гентамицина-основания и его полимерного производного в отношении *S. aureus* и *E. coli*. Для данных тест-культур значения МБСК и МБЦК в пределах погрешности определения оказались одинаковыми и низкими (0.122–0.25 мкг/мл) как для антибиотика, так и его полимерного комплекса, содержащего 25% ГО. Эти данные свидетельствуют о том, что антибактериальная активность ГО как в отношении *S. aureus*, так и *E. coli*, не изменилась при связывании его с сополимером ГПМА-АК ионной связью.

В табл. 2 приведены диаметры зон бактерицидности, характеризующие антибактериальную активность полученного полимерного комплекса ГО в отношении основных возбудителей раневой инфекции (*S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*). Видно, что уже при низкой концентрации антимицробного полимера (2.5 мг/мл) достигаются широкие зоны бактерицидности (10–12 мм), свидетельствующие о высокой активности АП в отношении использованных тест-организмов.

Исследование антисептических свойств АП в количественном суспензионном тесте по отношению к *S. aureus* показало (табл. 3), что действие полимерного комплекса ГО в концентрации 0.03% на клетки *S. aureus* за время не менее 15 мин снижает концентрацию жизнеспособных микробных клеток более чем на 5 порядков, что соответствует фактору подавления 5.7. Это позволяет констатировать, что требуемый регламентный фактор подавления (4.5), характеризующий высокую антимицробную актив-

ность вещества, достигается при концентрации испытуемого препарата, ~0.02%. Таким образом, данные табл. 2 свидетельствуют о том, что испытанный полимерный комплекс ГО обладает выраженным бактерицидным эффектом при искусственной контаминации взвесью культур *S. aureus*. Обнаруженная высокая антимицробная активность полимерного комплекса ГО в сочетании с низкой токсичностью открывают перспективу использования его в лечебных целях как самостоятельного, так и для сорбции на волокнистые имплантаты.

Результаты по определению антимицробной активности образцов тканей, иммобилизованных полимерным комплексом ГО, методом инфицированного агара суммированы в табл. 4. Для всех образцов тканей диаметры зон ингибирования роста использованных тест-культур (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) возрастали с увеличением концентрации иммобилизуемого антимицробного полимера в растворе, достигая максимума при концентрации 0.5%. Пропитка ткани раствором полимерного комплекса при нагревании не ухудшала антимицробные свойства материала. Существенно, что антимицробная активность ткани в отношении всех исследованных тест-культур зависела от материала-субстрата. Наименьшую активность показала немодифицированная целлюлозная ткань (образец 1). По сравнению с ней немодифицированный углеродный носитель (образец 2) имел большее антимицробное действие, по-видимому, из-за его высокой сорбционной способности. Наиболее выраженный

антимикробный эффект получен при иммобилизации полимерного комплекса ГО на фосфорсодержащих углеродных волокнах в кислотной (образец 3) и, особенно, в солевой форме (образец 4). В последнем случае антибиотик закреплялся в структуре волокна посредством ионных химических связей между аминогруппами ГО и поверхностными фосфорнокислыми группами углеродного волокна, а также пропитывающим сополимером ГПМА-АК.

Таким образом, проведенное исследование позволило решить поставленную задачу – придать волокнистым углеродным тканям активность в отношении основных возбудителей гнойных воспалений ран и выявить углеродный материал с наиболее высоким антимикробным действием. Полученные антимикробные углеродные материалы могут быть использованы в качестве перевязочных материалов, дренажей, покрывающих рану, фиксирующих бинтов и в качестве компонентов сложных имплантатов.

Авторы выражают благодарность профессору Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии Н.А. Заикиной за исследование антимикробной активности полимерного комплекса ГО методом серийных разведений.

Работа выполнена в рамках договора о творческом сотрудничестве между Институтом высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург)

и Институтом общей и неорганической химии НАН Беларуси (г. Минск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Морозова А.А., Ермоленко И.Н. // Докл. АН БССР, 1981. № 9. С. 828–231.
2. Морозова А.А., Ермоленко И.Н., Данилов И.П. // Хим.-фарм. журн. 1983. № 11. С. 1362 – 1368.
3. Морозова А.А., Лыга Л.К., Ермоленко И.Н. // Журн. прикл. химии. 1989. № 12. С. 2777–2781.
4. Морозова А.А. // Хим.-фарм. журн. 1997. № 3. С. 53–55.
5. Морозова А.А., Брежнева Ю.В., Ананьева Н.В. // Химические волокна. 2000. № 1. С. 50–54.
6. Вирник А.Д. // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1985. № 4. С. 447–454.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства / 15 изд. М.: Новая волна, 2005. 1206 с.
8. Ухов А.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. № 11. С. 42–52.
9. Соловский М.В., Денисов В.М., Рядинская Н.Ю., Петухова Н.А., Окулова Н.В. // Журн. прикл. химии. 1999. № 8. С. 1368–1374.
10. Snyder S.Z., Sobocinski P.Z. // *Analyt. Biochem.* 1975. № 2. P. 284–288.
11. Соловский М.В., Никольская Н.В., Заикина Н.А. // Хим.-фарм. журн. 2002. № 2. С. 9–13.
12. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982. 452 с.

Antimicrobial Activity of Carbon Fiber Fabric Modified with a Polymer–Gentamicin Complex

M. V. Solovskii^a, V. I. Dubkova^b, N. P. Krut'ko^b, E. F. Panarin^a, M. Yu. Smirnova^a,
N. A. Belyasova^c, and O. I. Maevskaya^b

^a *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia*

e-mail: lab.2@mail.ru

^b *Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

e-mail: dubkova@igic.bas-net.by

^c *Belarusian State Technological University, Minsk, 220030 Belarus*

e-mail: n195404@tut.by

Received March 18, 2008

Abstract—Modified and unmodified carbon fiber supports were treated with solutions of a polymer–gentamicin complex, possessing high antimicrobial activity and low toxicity. It was found that the antimicrobial activity of modified carbon fiber fabrics depended on the nature of the support and on the immobilization conditions. The highest antimicrobial activity was observed with phosphorus-containing carbon fiber ion exchanger in salt form.