

УДК 541.64:547.995

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНОВОГО ПОКРЫТИЯ, ДОПИРОВАННОГО ФТОРСОДЕРЖАЩИМИ ХИНОЛИНАМИ

© 2023 г. И. С. Чашин<sup>a,\*</sup>, Е. И. Перепёлкин<sup>a,b</sup>, В. И. Дяченко<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук  
119334 Москва, ул. Вавилова, 28, Россия

<sup>b</sup>Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева  
125047 Москва, Миусская пл., 9, Россия

\*e-mail: chaschin@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 09.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

На основе хитозана и вновь синтезированного соединения фторхинолинового ряда – 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)хинолин-8-ола получен новый композит. Проведен сравнительный анализ его антимикробной активности с другими хитозановыми композитами, содержащими в своем составе применяемые в современной медицине такие антибиотики, как тетрациклин, ванкомицин и ципрофлоксацин. Продемонстрирована высокая эффективность 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)хинолин-8-ола при подавлении роста *Staphylococcus Aureus*. Установлена возможность получения хитозановых наночастиц, допированных новым композитом, для применения их в качестве “интеллектуального” покрытия биопротезов клапанов сердца, в том числе с использованием угольной кислоты. Найден подход, позволяющий формировать гибридный биоматрикс на основе стабилизированного глутаровым альдегидом ксеногенного перикарда с ковалентно привязанным к нему полимерным “экраном” из хитозановых наночастиц как нано(микро)контейнеров с антимикробными агентами. Методом ионного гелирования синтезированы стабильные наночастицы хитозана, допированные новым композитом, что подтверждается высоким значением дзета-потенциала ( $|\zeta| \sim 45$  мВ). С помощью микроскопии высокого разрешения идентифицировано ультратонкое покрытие из полимерных сферических наночастиц (~70 нм), имеющих высокую адгезию к коллагеновым фибриллам. Показана возможность реализации индуцированного изменением pH среды “умного” антимикробного ответа данного биопокрытия за счет вариантов конформации (раскручивания) полимерных наночастиц хитозана и высвобождения цидных агентов в случае роста патогена на его поверхности.

DOI: 10.31857/S2308113923700444, EDN: WZKYDB

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка эффективных антибактериальных покрытий пролонгированного действия для кардиоимплантатов имеет большое научное и социальное значение. В современной кардиохирургии с растущей интенсивностью применяют ксеногенные биологические протезы клапанов сердца, основу которых составляет достаточно прочный и эластичный материал – бычий перикард, сшитый глутаровым альдегидом [1]. Для увеличения продолжительности срока службы биопротезов и улучшения их механических характеристик весьма перспективно выглядит концепция создания защитного экрана, маскирующего свободные альдегидные группы, являющиеся инициаторами кальциноза [2], и коллагеновые фибриллы оттока крови.

Для получения протекторного покрытия на биопротезах применяют биосовместимый поли-

мер хитозан, способный маскировать остаточные альдегидные группы и обладающий антимикробными свойствами [3]. Благодаря полимерной структуре хитозана, можно значительно усилить антимикробные свойства протекторного покрытия, а также ввести программируемую антимикробную активность, которая “включается” при инфицировании ткани биопротеза. Действительно, подход усиления антимикробной активности с помощью нано- и микрочастиц хитозана выглядит очень интересным. Так, микрочастицы хитозана, синтезированные методом ионного гелеобразования, способны к высокоэффективному антимикробному воздействию на различные патогены, включая клинически устойчивые к антибиотикам даже при нейтральном pH, когда хитозан теряет антимикробную активность [4, 5]. Предположительно, микрочастицы хитозана связываются с белком внешней мембраны OmpA че-

рез водород, а также с липополисахаридами путем ионного взаимодействия, вызывая тем самым уничтожение бактерий [4]. Более того, микрочастицы хитозана не способствуют резистентности бактерий и не вызывают перекрестной резистентности, что является причиной множественной лекарственной устойчивости — одной из главных проблем для многих антибиотиков [5]. Высокая плотность положительного заряда наночастиц хитозана приводит к более сильному связыванию с отрицательно заряженной поверхностью бактерий [6, 7].

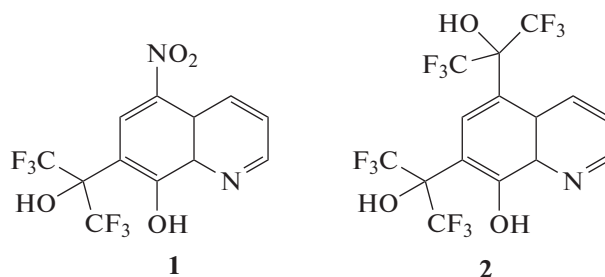
Наночастица хитозана также может быть использована в качестве эффективного наноразмерного контейнера, инкапсулированного (допированного) бактерицидными агентами, такими как антибиотики, пептиды или белки, а также различными синтетическими и природными соединениями [8–11]. Такой подход позволяет, с одной стороны, усилить антимикробные свойства хитозанового покрытия, а с другой — сохраняет биосовместимость протекторного покрытия за счет реализации подхода “интеллектуального” реагирования. При этом высвобождение потенциально цитотоксичных веществ происходит только в момент роста патогенной биопленки.

Основываясь на литературных данных, можно предположить, что хитозановое покрытие с наночастицами хитозана будет обладать более выраженной антимикробной и противогрибковой активностью по сравнению с простым хитозановым покрытием. Это достигается благодаря значительному увеличению площади поверхности, создаваемой полимерным покрытием, и возможностью допировать частицы антимикробными веществами.

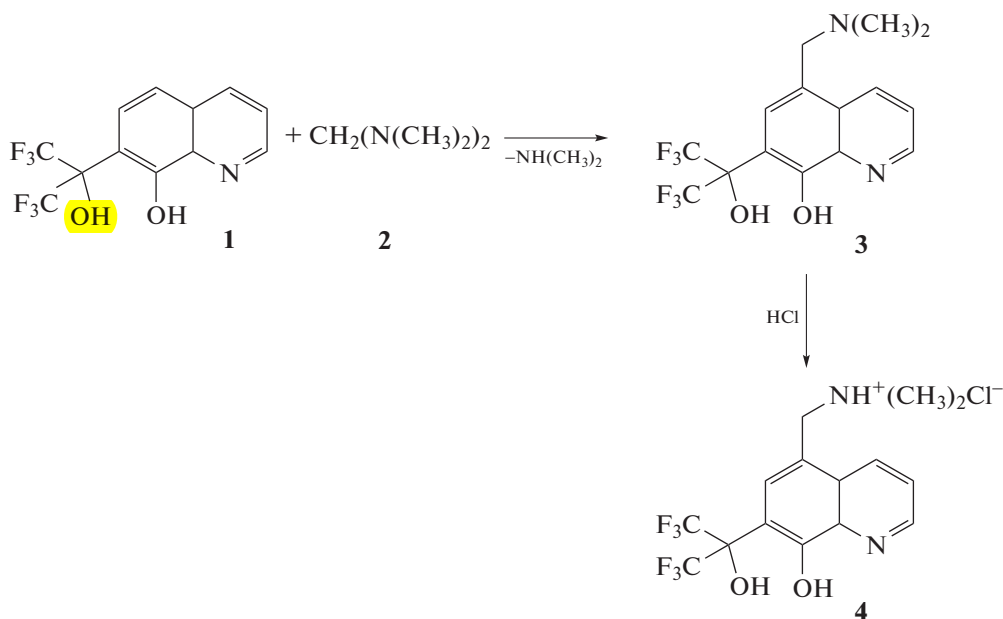
К сожалению, большинство высокоэффективных антибиотиков, в силу своей высокой лабиль-

ности (гидролиза, окисления и т.д.), малостабильны, поэтому быстро теряют эффективность. Поиск новых антибактериальных средств, не подверженных деградации в организме человека на протяжении длительного периода времени, является важной задачей.

Ранее было показано, что 5-нитро- и 5-гексафторизопропилокси-замещенные 7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметилэтил)-8-хинолины (**1**, **2**) соответственно обладают высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [12, 13]. При этом соединения **1** и **2** являются малотоксичными, но, к сожалению, не растворимыми в воде, что существенно усложняет получение на их основе функциональных композитов:



Таким образом, была поставлена задача представить близкое к **1**, **2** по структуре соединение (**3**), в молекуле которого вместо нитро- или гексафторизопропанольной группы в пятом положении находился бы заместитель  $(\text{Alk})_2\text{NCH}_2$ . Переведение соединения **3** (где  $\text{Alk}=\text{CH}_3$ ) в хлоргидрат (**4**) позволило бы добиться его растворимости в воде и, естественно, цитоплазме бактериальной клетки, в значительной степени положительно отразившись на его бактерицидных свойствах:



Разработка гибридных биоматериалов с биосовместимым полимерным покрытием и введенными в покрытие антимикробными агентами предстает важной задачей с точки зрения решения проблемы послеоперационного эндокардита, который является причиной осложнений в 1.4–3.1% случаев после протезирования клапанов сердца и до сих пор создает сложности в кардиохирургии [14]. Ранее [15] была продемонстрирована эффективность подхода объединения двух природных полимеров (коллаген перикарда и хитозан) в один гибридный биокомпозит с расширенной функциональностью в биосовместимом, экологичном и самонейтрализующемся растворе угольной кислоты, позволяющем, кроме того, адсорбировать покрытие в большем количестве за счет высокого давления. Свойство самонейтрализации угольной кислоты, при сбросе давления после нанесения покрытия, устранил проблему остаточного растворителя, обеспечив тем самым абсолютную биосовместимость антибактериальных гибридных матриц, применяемых в кардиохирургии.

Целью настоящей работы является синтез по реакции Манниха [11] нового соединения ряда хинолина – 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)-хинолин-8-ола (3); получение на его основе хитозанового композита, а также изучение структуры и антимикробных свойств биокомпозита, представляющего собой коллагеновую матрицу перикарда с покрытием из наночастиц хитозана с новым соединением, нанесенными из биологически безопасной угольной кислоты.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

В работе использовали гексафторацетон (98%) производства “P&M Invest Ltd.” (Россия); 8-оксихинолин (99%), N,N,N,N-тетраметилдиаминметан (99%) и хитозановый порошок с каталожным номером 448877 (молекулярная масса  $M_w = 1300$  кг/моль, степень деацетилирования  $CD = 73\%$ ) фирмы “Sigma-Aldrich” (США);  $CO_2$  высокой чистоты (99.995%) Московского газоперерабатывающего завода; воду, которую специально очищали непосредственно перед каждым экспериментом на установке “Millipore” Milli-Q. Также применяли триполифосфат натрия (ТПП) с каталожным номером 238503 (“Sigma-Aldrich”, США) в качестве сшивающего агента. На протяжении всего эксперимента использовали сверхчистый  $CO_2$  и свежую деионизированную воду (“Milli-Q Synthesis”, США).

Основой для биокомпозита служил химически фиксированный в 0.625% растворе глутарового альдегида (ГА) ксеноперикард телят. Образцы

коллагеновой ткани крупного рогатого скота стабилизировали и стерилизовали методом, применяемым в хирургической практике в Научном центре сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева. Как правило, он включает первичную очистку перикарда, его стабилизацию в водном растворе 0.625% ГА, промывку 1%-ным раствором додецилсульфата натрия и HEPES-буфером. Матрицы хранили в водном растворе 0.625% ГА. Перед использованием образцы перикарда разрезали на квадраты размером  $1 \times 1$  см и промывали стерильным физраствором.

В работе задействовали экспериментальную установку, состоящую из генератора высокого давления (“TharTechnologies”, США), который закачивает  $CO_2$  в самодельный стальной автоклав через набор капилляров. Такая установка может выдерживать давление до 80 МПа.

### Синтез 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)-хинолин-8-ола

Для реализации синтеза целевого 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)-хинолин-8-ола (АФОХ, соединение 3) по реакции Манниха осуществляли аминометилирование 8-оксихинолина (1) N,N,N,N-тетраметилметандиамином (2) при кипячении в метаноле (схема). Исходным веществом служил 7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)-8-хинолин, который получали из гексафторацетона и хинолин-8-ола, как описано в работе [16]. В круглодонную коническую колбу на 20 мл, снабженную обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой и магнитной мешалкой с нагревом, поместили 1.51 г (5 ммоль) 8-оксихинолина, 4 мл абсолютного метанола и 0.7 г (7 ммоль) N,N,N,N-тетраметилметандиамина. Реакционную массу кипятили при перемешивании на магнитной мешалке в течение 1 ч. Затем колбу охлаждали, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 80%-ным водным метанолом и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Получали 1.2 г (67.8%) белого кристаллического вещества;  $T_{пл} = 163–164^\circ C$ .

Спектры ЯМР  $^1H$  и ЯМР  $^{19}F$  АФОХ регистрировали в  $D_6$ -DMSO на спектрометре “Bruker Avance-400” с рабочими частотами 400 и 376 МГц соответственно. Хим. сдвиги в спектрах ЯМР  $^1H$  приведены в шкале  $\delta$  (м.д.) относительно остаточных протонов  $D_6$ -DMSO, в спектрах ЯМР  $^{19}F$  – в м.д. относительно  $CF_3CO_2H$  (внешний стандарт); константы спин-спинового взаимодействия – в Гц. Масс-спектр электронного удара снимали на квадрупольном масс-спектрометре “FINNIGAN MAT INCOS 50”. Прямой ввод, электронный удар, энергия ионизации 70 эВ.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_6$ -ДМСО;  $\delta_{\text{H}}$ , м.д.;  $J/\text{Гц}$ ): 9.27 (уш.с, 1H, OH); 8.60 (д, 1H,  $\text{H}^2$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 4$ ); 8.39 (д, 1H,  $\text{H}^4$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 8$ ); 7.36 (дд, 1H,  $\text{H}^3$ ,  $^3J_{\text{H-H}^4} = 8$ ,  $^3J_{\text{H-H}^2} = 4$ ); 7.21 (с, 1H,  $\text{H}^6$ ); 3.79 (с, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.28 (с, 6H,  $2\text{CH}_3$ ). Спектр ЯМР  $^{19}\text{F}$  ( $\text{D}_6$ -ДМСО;  $\delta_{\text{F}}$ , м.д.;  $J/\text{Гц}$ ): 2.51 (с, 6F,  $2\text{CF}_3$ ). Масс-спектр,  $m/z$ , (%): 368(34) [ $\text{M}^+$ ], 324(100), 255(10), 242(6), 186(4), 172(4), 157(4), 129(4), 69(4), 58(14), 44(13):

Для $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_2$	C	H	N	F
Найдено, %:	49.14	3.76	8.01	30.56
Вычислено, %:	48.92	3.83	7.61	30.95

Новое соединение 3 растворимо в полярных органических растворителях. За счет третичной аминогруппы, способной к солеобразованию, оно также растворимо в слабокислой водной среде.

#### *Синтез композитов хитозана с тетрациклином, ванкомицином и ципрофлоксацином*

К 1%-му раствору хитозана в уксусной кислоте при интенсивном перемешивании прикапывали гидрохлорид тетрациклина (хитозан/ТЕТ), гидрохлорид ванкомицина (хитозан/ВАНК), гидрохлорид ципрофлоксацина (хитозан/ЦИП) и гидрохлорид АФОХ (хитозан/АФОХ) так, чтобы их мольное соотношение составляло 20 : 1. Далее пленки высушивали в чашках Петри при  $50^\circ\text{C}$  и нейтрализовали в 1 моль/л водном растворе NaOH. Для выявления возможности получения композитных хитозановых пленок с помощью угольной кислоты и дальнейшего изучения антимикробных свойств таких пленок, была получена пленка из хитозана, растворенного в угольной кислоте с добавлением тетрациклина. Растворение хитозана в угольной кислоте проводили следующим образом. Навеску хитозана (150 мг) погружали в герметичный стальной реактор объемом 30 мл, добавляли воду Milli-Q объемом 15 мл. После чего реактор герметизировали, нагнетали  $\text{CO}_2$  со скоростью нагнетания 10 г/мин до давления 30 МПа и ставили на магнитную мешалку (с частотой вращения 200–300 об/мин) в течение 5–7 суток при температуре  $23$ – $25^\circ\text{C}$ . По истечении указанного времени реактор декомпрессировали, разгерметизировали и при интенсивном перемешивании прикапывали к полученному 1%-му раствору хитозана гидрохлорид тетрациклина так, чтобы их мольное соотношение было 20 : 1. Затем пленку высушивали в чашке Петри без какой-либо дальнейшей нейтрализации, в силу самонейтрализации угольной кислоты при образовании пленки.

#### *Синтез наночастиц хитозана, допированных АФОХ*

В реактор высокого давления помещали 100 мг хитозана, добавляли 15 мл воды и магнитную мешалку. В реактор накачивали  $\text{CO}_2$  со скоростью потока 10 г/мин до давления 30 МПа. Хитозан растворяли при температуре  $25^\circ\text{C}$  и перемешивании в течение 5 суток. Затем реактор медленно декомпрессировали до атмосферного давления в течение 1 ч. После вскрытия реактора при интенсивном перемешивании прикапывали гидрохлорид АФОХ так, чтобы их мольное соотношение составляло 20 : 1. Также в реактор при перемешивании прикапывали 1 мл водного раствора триполифосфата натрия, чтобы соотношение хитозана к ТПП составляло 6 : 1. Далее реактор герметично закрывали и закачивали  $\text{CO}_2$  до 30 МПа. Экспозицию выдерживали при  $25^\circ\text{C}$  и перемешивании в течение 4 суток. После медленной декомпрессии раствор наночастиц хитозана допированных АФОХ (хитозан/АФОХ) использовали для физико-химического анализа.

#### *Нанесение покрытия из наночастиц хитозан/АФОХ на перикард из раствора в угольной кислоте*

Образцы ксеноперикарда помещали в автоклав, содержащий водную суспензию наночастиц хитозан/АФОХ. Затем реактор герметизировали, и в него закачали 30 МПа  $\text{CO}_2$  со скоростью потока 10 г/мин. Экспозицию осуществляли в течение 3 ч при температуре  $25^\circ\text{C}$ . После экспозиции автоклав медленно декомпрессировали и извлекали образцы перикарда для дальнейших исследований структуры и свойств.

#### *Спектроскопия ИК НПВО и в УФ-области*

Исследования методом ИК НПВО-спектрокопии проводили с помощью прибора “ThermoNicolet IS5 FT-IR” с приставкой “ID5 ATR” (алмазный кристалл).

УФ-спектры образцов снимали с помощью спектрофотометра “HeliosAlpha” (“ThermoSpectronic”, США) в кварцевой кювете с шагом 1 нм в диапазоне длины волн 190–850 нм.

#### *Анализ дзета-потенциала и размеров нанокompозитов*

Анализ осуществляли с помощью анализатора частиц “Malvern Zeta Sizer Nano ZS” (“Malvern Instruments Ltd.”, Великобритания) методом динамического рассеяния света (ДРС). В качестве падающего луча использовали лазер He–Ne мощностью 22 мВ (длина волны 632.8 нм). Функции распределения времени релаксации и гидродинамические радиусы рассчитывали с применением пакета анализа “CONTIN data”. Все эксперимен-

ты по динамическому рассеянию света проводили при углах рассеяния  $40^\circ$ – $150^\circ$ .

*Атомно-силовая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия поверхности перикарда с композитным хитозановым покрытием*

Наночастицы хитозан/АФОХ адсорбировали на подложку из свежесколотой слюды из раствора в угольной кислоте в соответствии с приведенной выше методикой за исключением того, что использовали небольшую концентрацию полимеров для хитозана (0.2 г/л). В реактор погружали свежесколотый с обеих сторон кусочек слюды с площадью поверхности  $\sim 1.5$  см<sup>2</sup>. Выдержку слюдяной подложки проводили в течение 3–4 ч при постоянной температуре 23–25°C и давлении 30 МПа. Экспозицию завершали довольно медленной декомпрессией: полное удаление CO<sub>2</sub> из реактора занимало  $\sim 15$  мин при скорости декомпрессии 0.3 г/мин. Далее субстрат извлекали из разобранного реактора и сканировали с помощью АСМ.

Наблюдения АСМ вели в “tapping-mode” режиме на воздухе при комнатных условиях (относительная влажность  $\sim 40$ – $60\%$ ) с использованием многорежимного микроскопа с контроллером “Nanoscope-III” (“Digital Instruments”, США). АСМ-изображения собирали с информационной плотностью  $512 \times 512$  точек при частоте сканирования 1 Гц. Использовали кремниевые кантилеверы “NCH-W” (“NanoWorld AG”, Швейцария) с резонансной частотой  $\sim 320$  кГц. Редактирование изображений АСМ и анализ, включая измерения высоты, выполняли с помощью программного обеспечения “Gwyddion” (Чешский институт метрологии, Чехия). Чтобы надежно оценить высоту и размеры нанесенных наночастиц над уровнем подложки, выполняли множество повторяющихся измерений ( $N = 200$ ) в разных местах образца, после чего применяли процедуру усреднения.

Нанесение наночастиц хитозан/АФОХ на модельную подложку осуществляли аналогично нанесению на биоматрицу (описано выше).

Морфологию внешней и внутренней сторон коллагеновых волокон изучали с помощью микроскопа “Hitachi SU 8000”. Подход к оптимизации аналитических измерений был представлен ранее в работе [17]. Перед сканированием образцы наклеивали на алюминиевую заготовку толщиной 25 мм и нанесли проводящий слой металла (Au : Pd = 60 : 40) толщиной  $\sim 10$  нм с применением техники магнетронного напыления [18]. Морфологию образцов исследовали с учетом поверхностных эффектов проводящего металлического слоя. Изображения получали на рабочем

расстоянии 8–10 мм в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 2–20 кВ.

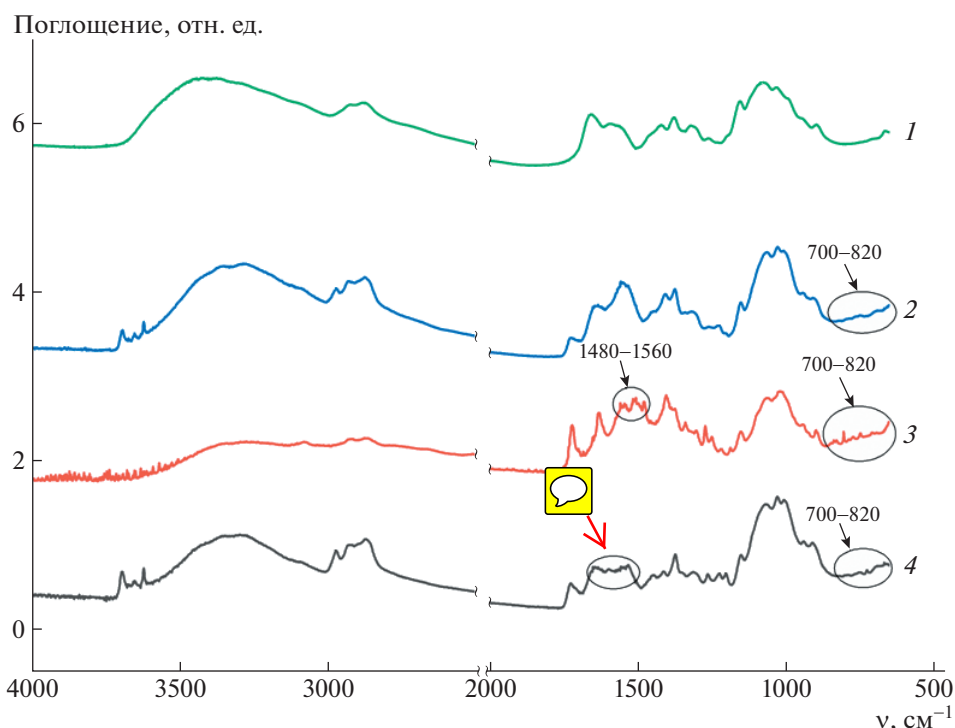
*Исследование антимикробности композитов хитозана с антибиотиками методом определения зоны лизиса*

Для подтверждения антимикробной активности выполняли исследования полученных композитных пленок хитозана с антибиотиками, а также с АФОХ и чистым хитозаном в качестве контрольного образца. Образцы получали методом полива из раствора уксусной кислоты и угольной кислоты (для одной из пленок с тетрациклином). Антимикробную активность оценивали по зоне лизиса вокруг образцов пленок размером  $1 \times 1$  см, помещенных на плотную питательную среду с посеянным газоном музейным штаммом (АТСС 29213) тест-культуры – *Staphylococcus aureus*.

*Антимикробное изучение перикарда с покрытием из наночастиц хитозан/АФОХ*

Оценку бактериальной адгезии и выживаемости модифицированных и контролируемых образцов коллагеновых перикардиальных матриц проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 11737-1-2012. Для выявления антимикробного ответа биоматрицы с покрытием из наночастиц хитозан/АФОХ выполняли сравнительный анализ количества бактерий, инкубированных на матрицах и образовавшихся после кратковременной инкубации (через 4 ч – “Адгезия”) и длительной (через 24 ч – “Выживаемость”). В качестве тест-культуры выбрали клинический штамм обеих грамположительных бактерий: *S. Aureus* (MSSA, штамм АТСС 29213). Выбор этого вида бактерий в исследовании был обусловлен тем фактом, что он чаще всего вызывает послеоперационный эндокардит имплантатов.

Тестируемые образцы размером  $\sim 1 \times 1$  см в поперечном направлении погружали в суспензии бактериальных культур ( $10^6$  клеток/мл, стандарт Макфарланда [19]) и инокулировали при температуре 37°C в течение 4 ч. Этого времени достаточно для адгезии, но не для роста бактерий. Далее использовали эти образцы для оценки в них количества КОЕ. По истечении инокуляции образцов в микробных суспензиях в течение 4 ч образцы с адгезированными микробами дополнительно хранили в течение 24 ч при 37°C в стерильных чашках Петри на поверхности стерильной многослойной марлевой ткани, обильно смоченной стерильным 0.9%-ным раствором хлорида натрия. После этого дополнительного выращивания микроорганизмов в течение 24 ч инкубации определяли количество КОЕ для каждого образца.



**Рис. 1.** ИК НПВО-спектры: 1 – контрольная хитозановая пленка; 2, 3, 4 – композиты хитозан/ТЕТ, хитозан/ЦИП, хитозан/АФОХ соответственно.

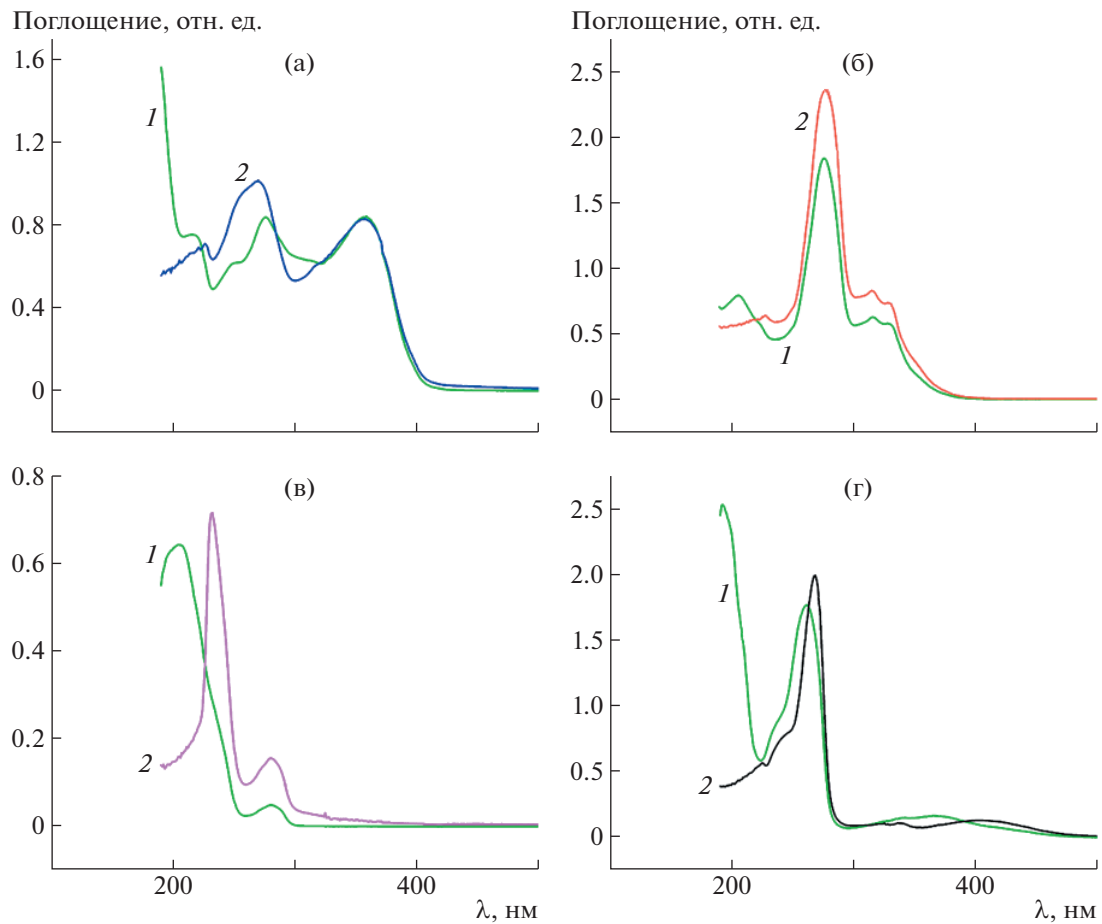
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Межмолекулярные взаимодействия в образцах композитных пленок были определены на основании данных ИК-спектров (рис 1). На спектрах 2–4 комплексов хитозан/ТЕТ, хитозан/ЦИП и хитозан/АФОХ отчетливо идентифицируются характеристические частоты поглощения хитозана около  $1650\text{ см}^{-1}$  (N–H),  $1380\text{ см}^{-1}$  (O–H),  $1080\text{ см}^{-1}$  (C–O, C–N) [20],  $2970\text{ см}^{-1}$  (H–связи) [21], которые сдвинуты относительно полос пленки из чистого полимера (спектр 1) в область низких частот, что свидетельствует об образовании водородных связей и донорно-акцепторном взаимодействии между хитозаном и инкапсулированными веществами. Кроме того, на спектрах композитов проявляется система пиков в области  $700\text{--}820\text{ см}^{-1}$  (C–H, ароматические углеводороды), а также увеличивается количество пиков в области типичной для карбонильных групп  $1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$  (C=O), которые присутствуют в веществах внедренных в полимерную матрицу. Стоит отметить пики при  $1200$  и  $1220\text{ см}^{-1}$  (C–F) на спектрах композитов хитозана с фторсодержащими ципрофлоксацином и АФОХ (рис. 1, спектры 3 и 4), являющиеся для них характерными [15].

На УФ-спектрах (рис. 2) зарегистрированы максимумы поглощения исходного противомик-

робного вещества и его композита с хитозаном, при этом на спектре комплекса наблюдается сдвиг пика в область коротких волн относительно исходного вещества, что свидетельствует об образовании водородных связей между полимером и инкапсулированным веществом. Причем более выражено смещение двух пиков ( $260\text{--}270$  и  $370\text{--}400\text{ нм}$ ) у комплекса хитозан/АФОХ (рис. 2г), что указывает на образование более стабильного комплекса по сравнению с другими вариантами.

После определения возможности получения композита хитозан/АФОХ была изучена его антимикробная активность в сравнении с другими, широко применяемыми антибиотиками. Установлено, что, во-первых, сама хитозановая пленка без антибиотика не имеет выраженную активность, во-вторых, антимикробная активность получаемых композитов не зависит от растворителя хитозана, и, в-третьих, для нового хитозанового композита было показано существенное подавление роста грамположительных бактерий *S. Aureus*, являющихся основной причиной послеоперационных осложнений (рис. 3; табл. 1) [22]. Действительно, для композита с АФОХ антимикробная активность относительно данного патогена находится на уровне полимерного композита с широко применяемым в кардиохирургии ванкомицином [23, 24]. Важно, что дополнительным методом контроля наличия и равномерности рас-



**Рис. 2.** УФ-спектры антибиотиков тетрациклин (а), ципрофлоксацин (б), ванкомицин (в) и композита АФОХ (г): 1 – исходное вещество, 2 – комплекс с хитозаном.

пределения АФОХ в хитозановом композите выступает детектирование люминесценции данного вещества в УФ-диапазоне электромагнитного излучения при длине волны 365 нм [25], что и было обнаружено для пленки с АФОХ (рис. 3б, фотография пленки “6”).

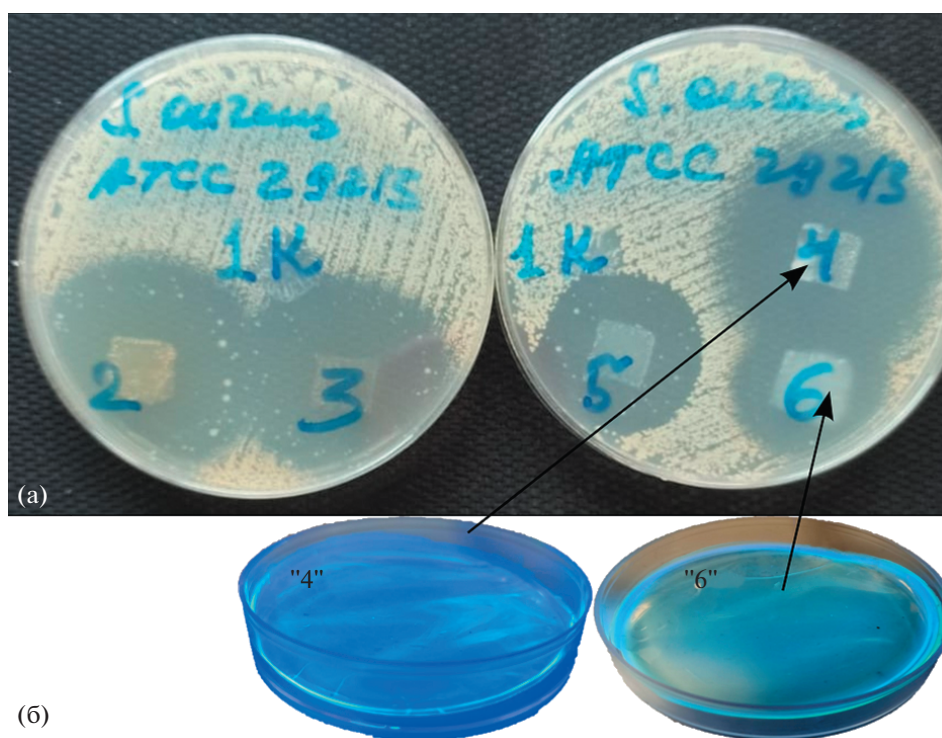
Таким образом, исходя из устойчивости комплекса хитозан/АФОХ и его усиленной антимикробной активности, покрытие из такого композита, особенно в виде полимерных наночастиц, получаемых и наносимых из биологически безвредной и самонейтрализующейся угольной кислоты, может существенно улучшить характеристики биопротеза в плане усиления антимикробных свойств.

Методом ДРС было выявлено, что в растворах угольной кислоты формируются устойчивые наночастицы хитозана, допированные АФОХ с высоким значением дзета-потенциала ( $|\zeta| = 45 \pm 5$  мВ). При этом данные светорассеяния свидетельствуют об относительно однородном распре-

делении получаемых наночастиц со средним диаметром  $\sim 50\text{--}80$  нм (рис. 4).

Для выявления размеров наночастиц хитозан/АФОХ и особенностей их адсорбции на поверхность биоматериалов из раствора в угольной кислоте был проведен эксперимент нанесения таких структур на атомарно гладкую поверхность свежесколотой слюды, имеющей отрицательный заряд в водных растворах [26], что моделирует отрицательно заряженную поверхность коллагеновых матриц [27]. Оказалось, что даже при очень малых значениях концентрации полимерные наночастицы адсорбируются на поверхность подложки равномерно и средний размер наночастиц из анализа изображений АСМ составляет  $\sim 70\text{--}120$  нм (рис. 5), это вполне соотносится с данными светорассеяния, учитывая артефакт уширения профилей зондированных структур вследствие конечности размеров зонда кантилевера.

Доказательство возможности получения прочного покрытия из наночастиц хитозан/АФОХ на



**Рис. 3.** а – Результаты антимикробной активности хитозановых композитов с антибиотиками как образование зон лизиса относительно бактерий *S. aureus* (штамм ATCC 29213) вокруг исследуемых образцов; б – пленки хитозан/ЦИП (“4”) и хитозан/АФОХ (“6”), люминесцирующие при УФ-облучении при длине волны 365 нм.

стабилизированном в глутаровом альдегиде перикарде (ГА-перикард) при нанесении из растворов наночастиц в угольной кислоте представлено с помощью метода ИК НПВО-спектроскопии (рис. 6). В качестве эталона использовались образцы ГА-перикарда без покрытия (спектр 1) и с хитозановым покрытием, также нанесенным из угольной кислоты (спектр 2). На результирующем спектре для эталонных и опытного образцов наблюдаются пики 1450 и 1550  $\text{см}^{-1}$  (N–H, ами-

ны), типичные для коллагеновой ткани. У спектра опытного образца, как и у контрольного с обычным хитозановым покрытием, были обнаружены пики 1370  $\text{см}^{-1}$  (C–N, алифатические) и 900  $\text{см}^{-1}$  (N–H, амины), характерные для хитозана (спектр 3) [20]. Кроме того, пик  $\sim 1700 \text{ см}^{-1}$ , характерный для колебаний валентной связи C=N, подтверждает ковалентное связывание аминогруппы поверхности наночастиц хитозана с остаточными карбонильными группами на поверхно-

**Таблица 1.** Сравнительный анализ антимикробной активности хитозановых композитов с антибиотиками согласно методу оценки диаметров зон лизиса относительно бактерий *S. aureus* (штамм ATCC 29213) вокруг исследуемых образцов (согласно рис. 3)

Образец, №	Композит	Зона лизиса, мм			Значение зоны лизиса (среднее $\pm$ СД, $n = 30$ ), мм
		#1	#2	#3	
1	хитозан	0	0	0	0
2	хитозан/ТЕТ (уксусная кислота)	39	40	39	$39.5 \pm 0.6$
3	хитозан/ТЕТ (угольная кислота)	39	40	40	$39.7 \pm 0.6$
4	хитозан/ЦИП	43	45	42	$43.5 \pm 1.5$
5	хитозан/ВАНК	30	27	28	$28.5 \pm 1.5$
6	хитозан/АФОХ	25	25	23	$24.5 \pm 1.1$



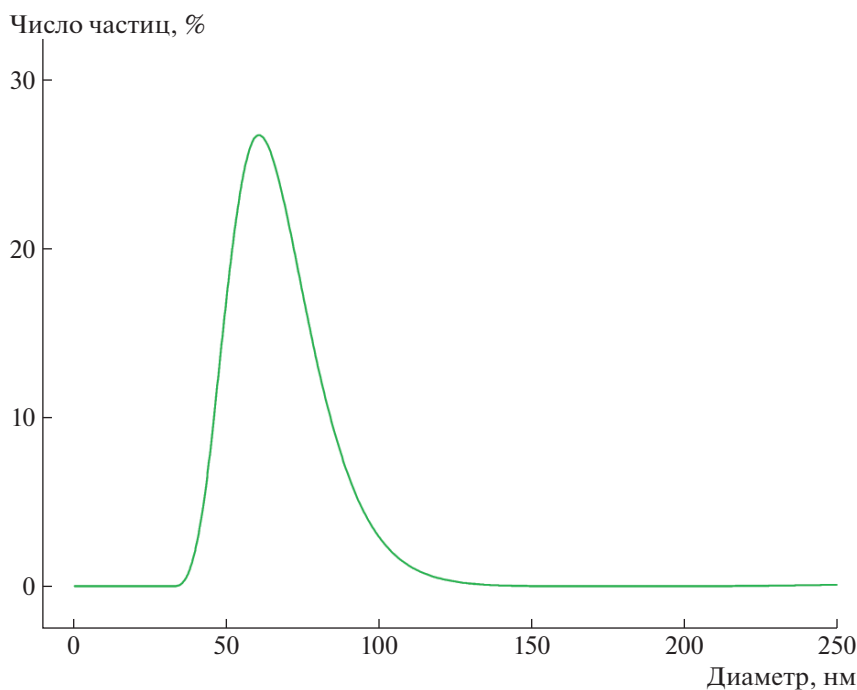


Рис. 4. Распределение наночастиц хитозан/АФОХ по размерам в растворе в угольной кислоте, согласно методу ДРС.

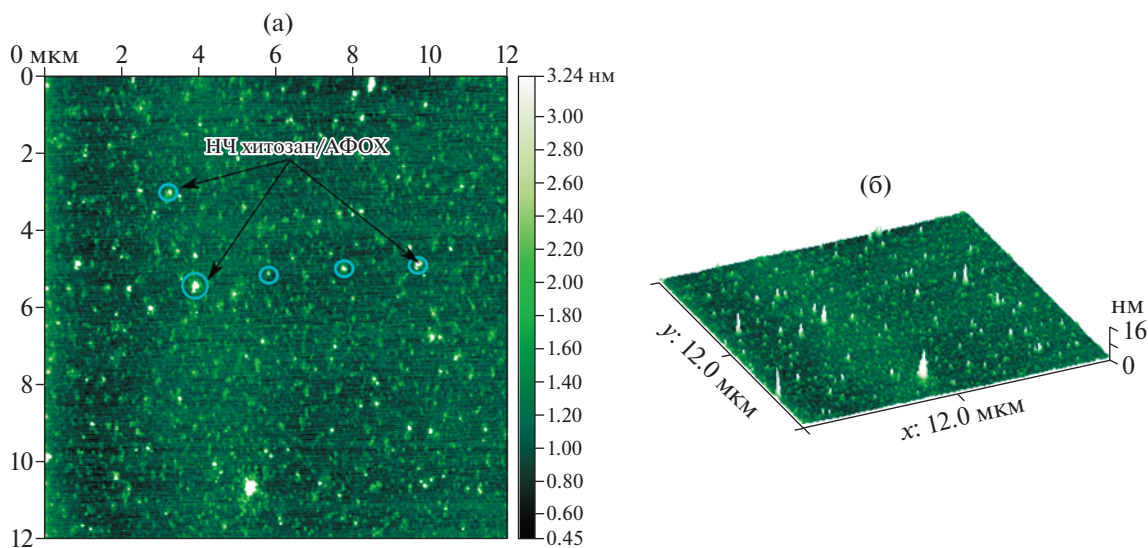
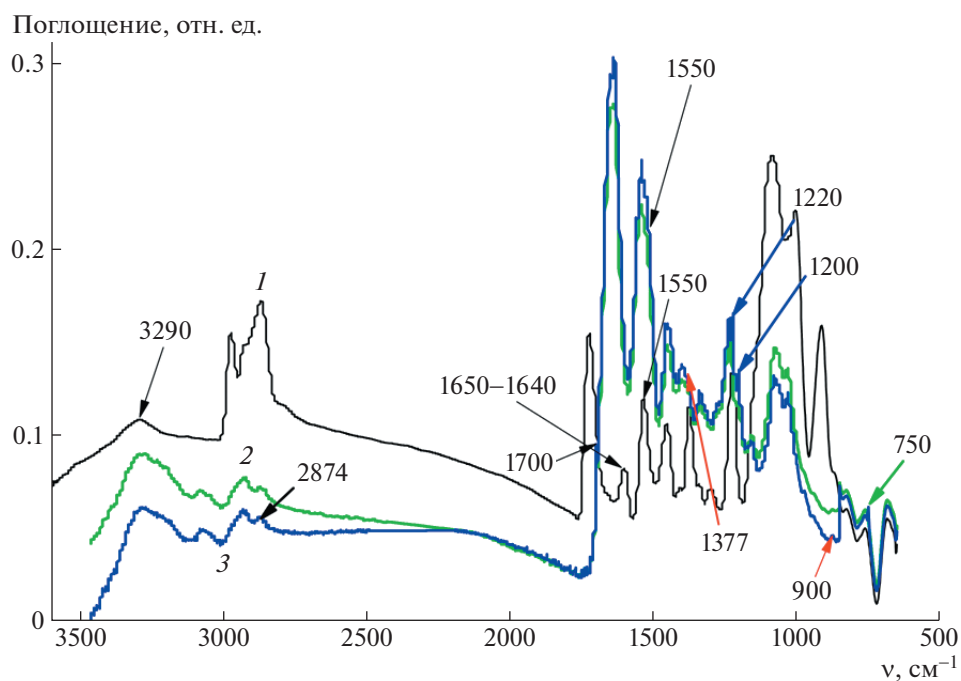


Рис. 5. АСМ-микрографии поверхности атомарно гладкой слюды, погруженной в раствор наночастиц хитозан/АФОХ в угольной кислоте и высушенной на воздухе: а — сканируемая область площадью  $12 \times 12$  мкм<sup>2</sup>, б — 3D-изображение этой области. Кружками указаны некоторые полимерные наночастицы.

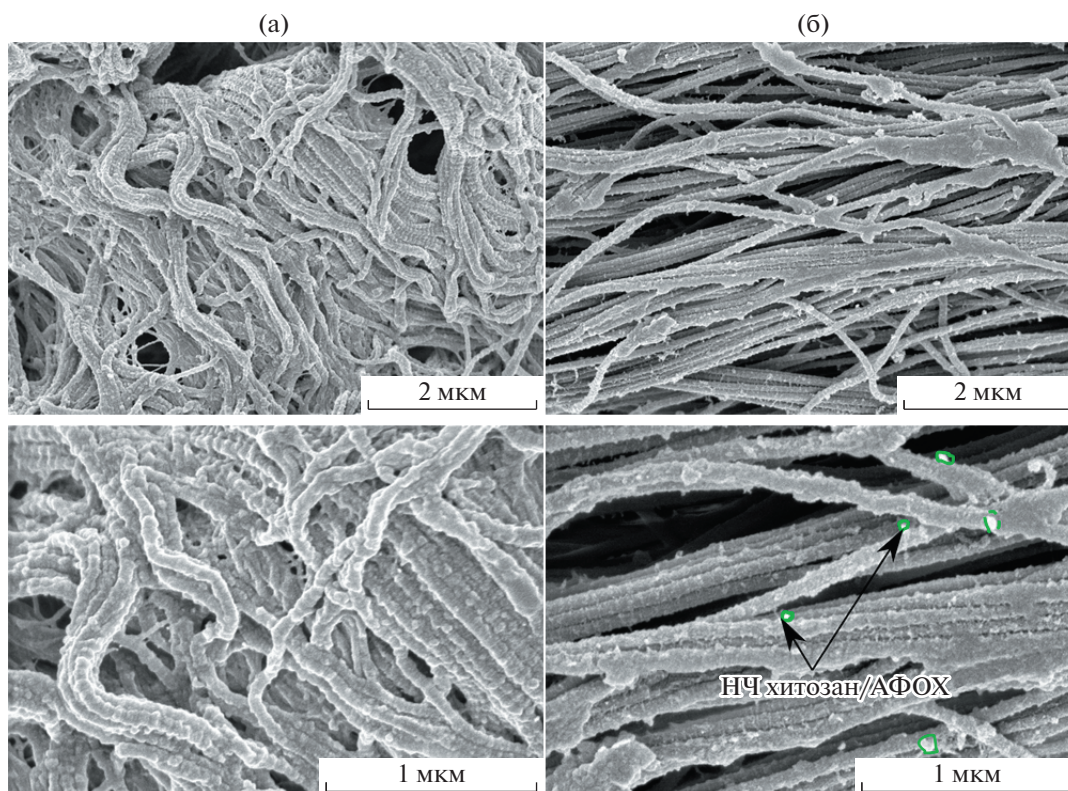
сти перикарда. Однако для опытного образца были обнаружены пики в области  $750 \text{ см}^{-1}$  (система связи P–O), характерные для связующего вещества триполифосфата [28], а также пики при  $1200$  и  $1220 \text{ см}^{-1}$  (C–F), обнаруженные в модельном композите хитозан/АФОХ, что также свидетель-

ствует о присутствии наночастиц хитозан/АФОХ на поверхности перикарда.

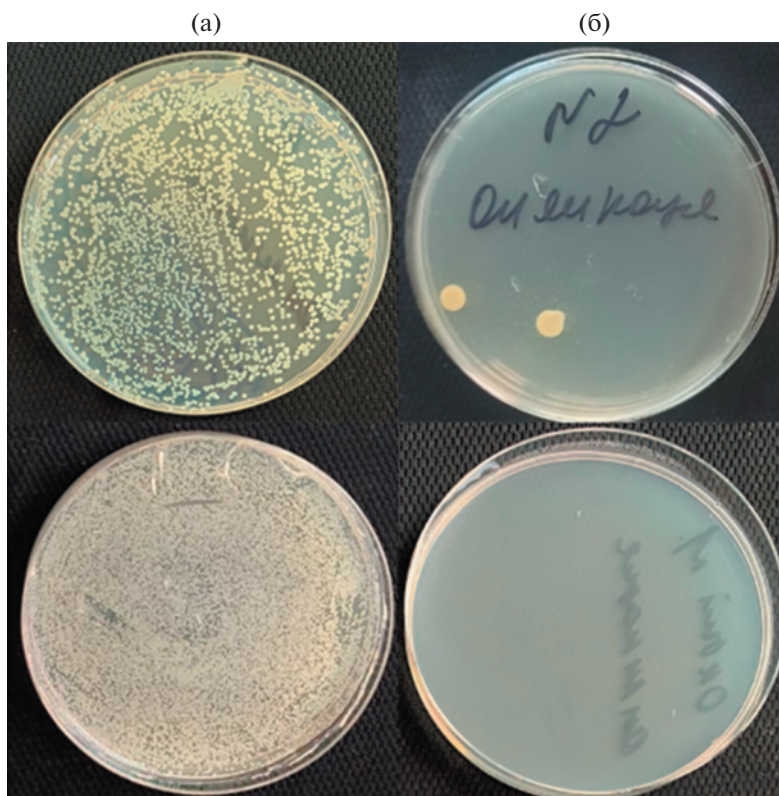
Наличие полимерных наночастиц, которые значительно меняют морфологию обычных коллагеновых фибрилл, подтверждено с помощью прямого метода контроля СЭМ. Из анализа



**Рис. 6.** ИК НПВО-спектры ГА-перикарда: 1 – исходный контрольный; 2 – с обычным хитозановым покрытием, нанесенным из раствора в угольной кислоте; 3 – с покрытием на основе наночастиц хитозан/АФОХ, полученных и нанесенных с помощью угольной кислоты. Стрелками указаны пики спектров на характеристических частотах коллагена и веществ, присутствующий в композите (хитозан, ТПП, АФОХ).



**Рис. 7.** СЭМ-микрографии поверхности ГА-перикарда с хитозановым покрытием, нанесенным из растворов в угольной кислоте (а), и с покрытием на основе наночастиц хитозан/АФОХ, полученных и нанесенных с помощью угольной кислоты (б). Увеличение верхнего ряда изображений 20к, нижнего – 50к.



**Рис. 8.** Бактерицидная активность по отношению к *S. Aureus* (штамм ATCC 29213) образцов перикарда из нативного коллагена (а) и покрытого наночастицами хитозан/АФОХ (б). Суспензию *S. Aureus* инкубировали с образцами в течение 4 ч (“адгезия”) – верхний ряд изображений или 24 ч (“выживаемость”) – нижний ряд.

СЭМ-микрографий (рис. 7) удалось выявить, что поверхность коллагеновых фибрилл “облеплена” сферическими структурами диаметром  $\sim 70 \pm 20$  нм. Подобное “облепление” коллагеновых фибрилл может быть однозначно связано только с адсорбцией полимерных наночастиц, поскольку на контрольном образце ГА-перикарда с обычным хитозановым покрытием (рис. 7а), также нанесенным из растворов в угольной кислоте, таких структур обнаружено не было (рис. 7б). Так, полимерные наночастицы довольно однородны по размеру и равномерно адсорбируются на поверхности биоматрицы, что соответствует результатам модельного эксперимента по исследованию морфологии атомарно гладкой подложки слюды, экспонированной в разбавленном растворе полимерных наночастиц.

В данной работе также исследована способность покрытия на основе наночастиц хитозан/АФОХ к подавлению патогенной биопленки непосредственно на перикардиальном матрикесе биопротеза. Было обнаружено, что покрытие из наночастиц хитозан/АФОХ на коллагеновых матрицах фактически полностью подавляет адгезию и абсолютно подавляет дальнейший рост бактерий *S. Aureus* на биоматрице (выживаемость), в то

время как тестируемый образец коллагена без покрытия очень хорошо адгезирует патогены на поверхности и не ингибирует их дальнейший рост (рис. 8; табл. 2). То обстоятельство, что даже малое количество адсорбированных на матриксе с новым покрытием бактерий впоследствии уничтожается, определяется поликатионным строением хитозана. Действительно, в процессе роста патогенной биопленки происходит выделение уксусной и молочной кислот как продукта жизнедеятельности бактерий [29], что локально понижает pH возле наночастиц. В результате этого, большее количество заряженных звеньев поликатиона испытывает взаимное отталкивание, обеспечивая тем самым эмиссию антимикробного

**Таблица 2.** Количество КОЕ *S. Aureus*, адгезированных и выживших на бычьем перикарде, покрытом наночастицами хитозан/АФОХ по сравнению с контрольными образцами нативного бычьего перикарда

Образец	Адгезия	Выживаемость
Нативный	$\sim 1.5 \times 10^3$	$\sim 10^5$
Наночастицы хитозан/АФОХ	$\sim 2-5$	$\sim 0$

агента (чья активность, как было выяснено на модельных композитных пленках, относительно патогенов значительно выше, чем самого поликатиона) из полимерных частиц. Похожий “интеллектуальный” эффект наблюдается у более сложного бислойного полиэлектролитного покрытия с внедренным антибиотиком [30], однако за счет сшивки хитозановых цепей в полимерные наночастицы, подобного интересного свойства покрытия можно добиться одностадийным нанесением таких полимерных структур.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультратонкое хитозановое покрытие коллагена ксеноперикарда, допированное вновь синтезированным 5-диметиламинометил-7-(2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-трифторметил-этил)хинолин-8-олом, эффективно подавляет рост патогенных бактерий *Staphylococcus Aureus* – основного возбудителя постинфекционного эндокардита. В составе его композита антибактериальная активность, сравнимая с “золотым” стандартом в кардиохирургии – ванкомицином, но, в отличие от последнего, имеет пролонгированное действие.

Результаты ИК-спектроскопии свидетельствуют об образовании водородных связей и донорно-акцепторном взаимодействии между β-D-глюкозаминными звеньями хитозана и АФОХ, что предполагает относительную устойчивость данного комплекса.

Показана возможность получения устойчивого покрытия из данного композита в форме хитозановых частиц, допированных АФОХ и при помощи метода ионного гелирования непосредственно на матриксе биопротеза, при нанесении из стерилизующего и самонейтрализующегося растворителя хитозана – угольной кислоты. Установлено, что таким способом можно получить однородное покрытие, способное полностью подавлять рост патогенной пленки *S. Aureus* на биопротезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-23-00559).

ЯМР-исследования синтезированного антимикробного вещества (АФОХ) проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул Института элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jana S., Tefft B.J., Spoon D.B. // *Acta Biomater.* 2014. V. 10. P. 2877.
2. Schoen F.J., Levy R.J. // *Ann. Thorac. Surg.* 2005. V. 79. P. 1072.
3. Wenjie W., Changhu X., Xiangzhao M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4532.
4. Jeon S.J., Oh M., Yeo W.-S., Galva K.N., Jeong K.C. // *Plos. One.* 2014. V. 9. P. 92723/1.
5. Ma Z., Kim D., Adesogan A.T., Ko S., Galvao K., Jeong K.C. // *ACS Appl. Mater.* 2016. V. 8. P. 10700.
6. Chung Y., Su Y., Chen C., Jia G., Wang H., Wu J.C.G., Lin J. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2004. V. 25. P. 932.
7. Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. // *Carbohydr. Res.* 2004. V. 339. P. 2693.
8. Ngyuen T.V., Ngyuen T.T.H., Wang S.-L., Ngyuen A.D. // *Res. Chem. Intermed.* 2017. V. 43. P. 3527.
9. Maya S., Indulekha S., Sukhithasri V., Smitha K.T., Shantikumar V.N., Jayakumar R., Biswas R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. V. 51. P. 392.
10. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M.J. // *J. Control. Release.* 2001. V. 73. P. 255.
11. Tramontini M., Angiolini L. // *Tetrahedron.* 1990. V. 46. № 6. P. 1791.
12. Dyachenko V.I., Kolomiets A.F., Fokin A.V., Aleksandrova G.A., Rychkova M.I. // *Byul. Izobret.* 2007. V. 18. P. 1793687.
13. Chaschin I.S., Perepelkin E.I., Dyachenko V.I. // *Dokl. Phys. Chem.* 2021. V. 501. P. 114.
14. Бокерия Л.А., Гудкова П.Г. Сердечно-сосудистая хирургия. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. М.: ФГБУ НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева Минздрава России, 2015.
15. Chaschin I.S., Badun G.A., Chernysheva M.G., Grigorev T.E., Krashennnikov S.V., Anuchina N.M., Bakuleva N.P. // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2019. V. 94. P. 213.
16. Dyachenko V.I., Galachov M.V., Kolomietz A.F., Fokin A.V. // *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* 1989. V. 38. № 12. P. 2550.
17. Kachala V.V., Khemchyan L.L., Kashin A.S., Orlov N.V., Grachev A.A., Zalesskiy S.S., Ananikov V.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2013. V. 82. P. 648.
18. Kashin A.S., Ananikov V.P. // *Russ. Chem. Bull.* 2011. V. 60. P. 2602.
19. McFarland J. // *J. Am. Med. Assoc.* 1907. V. 49. P. 1176.
20. Theapsak S., Watthanaphanit A., Rujiravanit R. // *ACS Appl. Mater. Int.* 2012. V. 4. P. 2474.
21. Akhil Kumar M.M., Biju V.M. // *New J. Chem.* 2020. V. 44. P. 8044.
22. Yu V.L., Fang G.D., Keys T.F., Harris A.A., Gentry L.O., Fuchs P.C., Wagener M.M., Wong E.S. // *Ann. Thorac. Surg.* 1994. V. 58. P. 1073.
23. Nunes A.P., Teixeira L.M., Iorio N.L., Bastos C.C., de Sousa Fonseca L., Souto-Padron T., dos Santos K.R. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006. V. 27. P. 307.

24. *Smith J.K., Bumgardner J.D., Courtney H.S., Smeltzer M.S., Haggard W.O.* // *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2010. V. 94. P. 203.
25. *Żamojć K., Wiczek W., Zaborowski B., Makowski M., Pranczk J., Jacewicz D., Chmurzyński L.* // *Spectrochim. Acta. A.* 2014. V. 133. P. 887.
26. *Sides P.J., Faruqi D., Gellman A.J.* // *Langmuir.* 2009. V. 25. P. 1475.
27. *Bet M.R., Goissis C., Vargas S., Sehswe-de-Araujo H.S.* // *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 131.
28. *Tomaz A.F., de Carvalho S.M.S., Barbosa R.C., Silva S.M.L., Sabino Gutierrez M.A., de Lima A.G.B., Fook M.V.L.* // *Materials.* 2018. V. 11. P. 2051.
29. *Albright V., Zhuk I., Wang Y., Selin V., van de Belt-Gritter B., Busscher H.J., van der Mei H.C., Sukhishvili S.A.* // *Acta Biomater.* 2017. V. 61. P. 66.
30. *Chaschin I.S., Sinolits M.A., Badun G.A., Chernysheva M.G., Anuchina N.M., Krasheninnikov S.V., Khugaev G.A., Petlenko A.A., Britikov D.V., Zubko A.V., Kurilov A.D., Dreger E.I., Bakuleva N.P.* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2022. V. 222. P. 2761.