

УДК 577.114+546.57+577.182.24

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ НАНОКОМПОЗИТА ХИТОЗАН-Ag И АНТИБИОТИКОВ ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО РЯДА

© 2022 г. А. Н. Красковский¹, *, В. В. Николайчук¹, К. С. Гилевская¹, В. И. Куликовская¹,
Е. А. Степанова², И. И. Кузьминский², Н. Опавски³, В. Е. Агабеков¹

¹Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

²Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского, Минск, 220063 Республика Беларусь

³Белградский университет, Белград, 11000 Сербия

*e-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 28.08.2021 г.

После доработки 25.10.2021 г.

Принята к публикации 05.11.2021 г.

Методом “зеленой химии” путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном синтезированы агрегативно устойчивые положительно заряженные (~45 мВ) наноконпозиты хитозан-Ag сферической формы с размером до 60.0 нм. Получены комплексы хитозан-Ag/цефтриаксон и хитозан-Ag/цефотаксим, содержащие до 1.06 ± 0.01 и 1.29 ± 0.03 мг антибиотика/мг хитозан-Ag соответственно. Установлено, что при увеличении соотношения цефтриаксон : хитозан-Ag в реакционной смеси с 0.5 до 1.25 эффективность связывания антибиотика с наночастицами возрастает с 7.2 ± 0.2 до $71.7 \pm 0.2\%$, а при увеличении соотношения цефотаксим : хитозан-Ag в реакционной смеси от 0.5 до 10 эффективность связывания антибиотика снижается с 66.2 ± 1.5 до $13.0 \pm 0.7\%$. Образование комплексов хитозан-Ag/антибиотик подтверждено методом ИК-спектроскопии. Установлена эффективность применения комплекса хитозан-Ag/цефотаксим против резистентных штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: хитозан, серебро, наноконпозит, гидротермальный синтез, антибиотик, антимикробная активность

DOI: 10.31857/S055510992202012X

Неконтролируемое и нерациональное применение антибактериальных препаратов при лечении различного рода инфекционных заболеваний является причиной появления и развития устойчивой антибиотикорезистентности бактерий [1]. В клинической практике устойчивость бактерий к антибиотикам представляет собой серьезную проблему, для решения которой необходима разработка новых классов антибактериальных препаратов [2–4].

Одним из перспективных способов преодоления бактериальной резистентности является использование наночастиц металлов, например, серебра [5], которые обладают широким спектром антимикробной активности [6–8]. При этом использование металлических наночастиц в комбинации с традиционными антибиотиками позволяет не только снизить используемые дозы и токсичность обоих компонентов, но и достичь синергизма антибактериального действия [4, 9–11]. Так, авторы [9, 10] показали, что антимикробная активность биогенных комплексов наночастиц серебра

с цефтриаксоном увеличивается по сравнению с чистыми наночастицами серебра. Повышенную антимикробную активность проявляли комплексы наночастиц серебра с цефотаксимом [12], бензилпенициллином [13, 14], тетрациклином [15], амоксициллином [16].

Для повышения агрегативной устойчивости наночастиц и улучшения их биосовместимости можно использовать полисахарид хитозан, который выступает в качестве восстановителя и стабилизатора [17, 18]. Хитозан обладает антимикробными свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий, некоторых видов грибов [19], а также способен оказывать синергетическое действие и повышать антимикробную активность антибиотиков [20, 21]. Наноконпозиты хитозан-Ag имеют широкий спектр антимикробной активности [17, 18, 22] и являются перспективным материалом для разработки новых классов антибактериальных препаратов.

Цель работы – получение комплексов наночастиц серебра, покрытых оболочкой хитозана, с

антибиотиками цефалоспоринового ряда и оценка их антимикробных свойств.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали хитозан (ММ ~ 30 кДа, степень деацетилирования >90%, “Glentham Life Sciences”, Великобритания), нитрат серебра ($\geq 99\%$, М = 169.88 г/моль, “Carl Roth”, Германия), цефотаксима натриевую соль (М = 477.5 г/моль) и цефтриаксона динатриевую соль (М = 661.6 г/моль, ОАО “Борисовский завод медицинских препаратов”, Беларусь).

Получение нанокompозита хитозан-Аг. Нанокompозит хитозан-Аг получали методом гидротермального синтеза путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном [22]. Продолжительность реакции 60 мин.

Получение комплексов хитозан-Аг/цефтриаксон. Комплексы хитозан-Аг с цефтриаксоном получали путем смешения их растворов при соотношении (по массе) антибиотик : хитозан-Аг от 0.5 до 8.0. Для этого 1 мл нанокompозита хитозан-Аг (2 мг/мл) добавляли к 1 мл антибиотика соответствующей концентрации. Далее реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 1 ч. Синтезированный комплекс хитозан-Аг/цефтриаксон отделяли центрифугированием при $24000 \times g$ (20 мин, 10°C). Количество несвязанного антибиотика определяли спектрофотометрически (при $\lambda = 270$ нм) по предварительно построенному калибровочному графику $A = 0.0506 \cdot C$.

Получение комплексов хитозан-Аг/цефотаксим. Комплексы хитозан-Аг с цефотаксимом получали путем смешения их растворов при соотношении антибиотик : хитозан-Аг (по массе) от 0.5 до 10. Для этого 1 мл нанокompозита хитозан-Аг (2 мг/мл) добавляли к 1 мл антибиотика соответствующей концентрации. Далее реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 1 ч. Полученные комплексы очищали диализом против дистиллированной воды в течение 5 сут. В процессе диализа трехкратно (через 1, 2 и 5 сут) отбирали по 20 мл диализной воды, замещая ее чистым растворителем. Количество несвязанного антибиотика определяли спектрофотометрически (при $\lambda = 260$ нм) по предварительно построенному калибровочному графику $A = 0.033 \cdot C$.

Определение гидродинамического диаметра и величины ζ -потенциала комплексов. Гидродинамический диаметр и величину ζ -потенциала комплексов хитозан-Аг/антибиотик определяли методом динамического светорассеивания и по их электрофоретической подвижности соответственно с помощью анализатора Zetasizer Nano-ZS (“Malvern”, Великобритания). Измерения проводили для предварительно разбавленных в 10 раз образцов.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры полученных комплексов записывали на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 (“Bruker”, Германия) в диапазоне частот $4000-400 \text{ см}^{-1}$. Образцы для исследования готовили в таблетках с KBr.

Определение синергетического потенциала нанокompозита хитозан-Аг с антибиотиком. При определении синергетического потенциала нанокompозита хитозан-Аг в сочетании с антибиотиками в качестве тест-культур были выбраны следующие штаммы: грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* коллекции микроорганизмов Института экспериментальной ветеринарии (Беларусь) (КМИЭВ В161) и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* (КМИЭВ В88), выращенные на мясо-пептонном агаре (МПА) без антибиотиков.

Определение бактерицидной активности исследуемых образцов проводили с использованием диско-диффузионного метода. Исследуемую бактериальную культуру в дозе 2×10^8 кл./мл засеивали газоном на среду АГВ (агар Гивенталья–Ведьминой) в чашки Петри. На стандартные бумажные диски, содержащие определенные дозы (30 мкг) антибиотиков (цефотаксима, цефтриаксона), добавляли по 0.1 мл нанокompозита хитозан-Аг ($C_{\text{хитозан}} = 8$ мг/мл, $C_{\text{Аг}} = 0.272$ мг/мл) и высушивали. Затем диски пинцетом помещали на засеянную поверхность агара и выдерживали в термостате при 37°C в течение 18–20 ч. Результаты оценивали по зоне задержки роста тест-культур вокруг диска.

На контрольные чашки Петри с агаром засеивали по 1 мл суспензий, содержащих по 2×10^8 кл. 18-часовой культуры, на засеянную поверхность пинцетом помещали бумажные диски, содержащие определенные дозы разных антибиотиков. Через 24 ч инкубирования при 37°C проводили визуальную оценку наличия роста тест-штамма в опытных пробах по сравнению с ростом тест-штамма в положительном контроле (питательная среда с тест-штаммом без препарата).

Изучение антимикробной активности комплексов хитозан-Аг/цефотаксим. При изучении антимикробных свойств комплексов нанокompозита хитозан-Аг и цефотаксима в качестве тест-культур были выбраны следующие резистентные штаммы: *Proteus vulgaris* (КМИЭВ В153), *Pseudomonas aeruginosa* (КМИЭВ В114), *S. aureus* (КМИЭВ В161), *Streptococcus agalactiae* (КМИЭВ В193), *E. coli* (КМИЭВ В88). Резистентные изоляты были выделены из материала, отобранного при обследовании коров, заболевших маститом и эндометритом, из сельскохозяйственных организаций. Клиническая резистентность подтверждена отсутствием эффекта при использовании максимально допустимых терапевтических доз антибиотика.

Определение чувствительности исследуемых образцов проводили с использованием метода “лунок” (диффузии в агар). Для постановки эксперимента использовали наноккомпозит хитозан-Ag, образец № 2 – цефотаксим, 0.25 мг/мл, образцы № 3, 4 и 5 – комплексы хитозан-Ag/цефотаксим, полученные при соотношении (по массе) антибиотик : хитозан-Ag 1 : 1, 2 : 1 и 4 : 1 соответственно и разбавленные до концентрации 0.25 мг/мл по цефотаксиму. В толще агара, содержащего суточную культуру микроорганизмов в дозе 2×10^8 кл./мл, стерильно делали лунки диаметром 6 мм. В лунки вносили исследуемые образцы в объеме 60 мкл и помещали в термостат при 37°C на 18–20 ч. В качестве контроля использовали диск с цефотаксимом (30 мкг). Результаты оценивали по зоне задержки роста тест-культур вокруг лунки.

На контрольные чашки Петри с агаром засеивали по 1 мл суспензий, содержащих по 2×10^8 кл. 18-часовой культуры тест-штамма. Через 24 ч инкубирования при 37°C проводили визуальную оценку наличия роста тест-штамма в опытных пробах по сравнению с ростом тест-штамма в положительном контроле (питательная среда с тест-штаммом без препарата).

Получение лиофилизированных порошков. Лиофилизированные порошки комплексов хитозан-Ag/цефотаксим получали на лиофильной сушке Freezone 1.0 (“Labconco”, США). В качестве криопротектора при сублимационном высушивании использовали глюкозу (5 мас. %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные наноккомпозиты хитозан-Ag представляли собой структуру “ядро-оболочка”, имели сферическую форму, размер от 1.0 до 60.0 нм и величину ζ -потенциала ~ 45 мВ [22].

В качестве активного компонента для получения комплексов были выбраны антибиотики группы цефалоспоринов III поколения широкого спектра действия: цефтриаксон и цефотаксим.

При изменении массового соотношения цефтриаксон : хитозан-Ag в реакционной смеси с 0.5 до 1.25 происходило увеличение эффективности связывания антибиотика с наночастицами на один порядок: с 7.2 ± 0.2 до $71.7 \pm 0.2\%$ (рис. 1). Дальнейшее увеличение цефтриаксона в реакционной смеси приводило к плавному снижению эффективности связывания и при 8-кратном избытке антибиотика по отношению к хитозан-Ag этот параметр составлял $14.2 \pm 0.3\%$ (рис. 1).

Как видно на рис. 2, содержание цефтриаксона в синтезируемом комплексе постепенно возрастало с 0.04 ± 0.01 до 1.06 ± 0.01 мг/мг хитозан-Ag при изменении соотношения цефтриаксон : хитозан-Ag с 0.5 до 2.0. При дальнейшем повы-

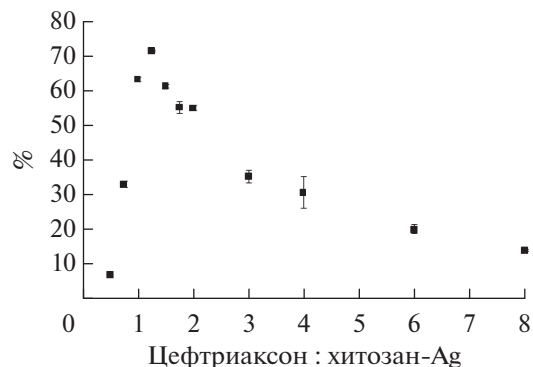


Рис. 1. Эффективность связывания цефтриаксона (%) с наночастицами хитозан-Ag в зависимости от соотношения цефтриаксон : хитозан-Ag в реакционной смеси.

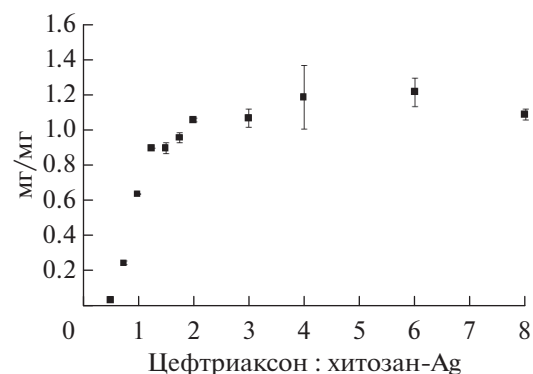


Рис. 2. Содержание цефтриаксона (цефтриаксон/хитозан-Ag, мг/мг) в полученных комплексах в зависимости от соотношения цефтриаксон : хитозан-Ag в реакционной смеси.

шению концентрации антибиотика в реакционной смеси его количество в комплексе оставалось неизменным (рис. 2), что свидетельствовало о достижении предельной емкости. Наблюдаемое (рис. 1) уменьшение эффективности связывания цефтриаксона в области его высоких концентраций также можно объяснить достижением максимального количества антибиотика, который способен связаться с наночастицами хитозан-Ag.

Величина ζ -потенциала исходных наночастиц хитозан-Ag составляла 45.4 ± 5.3 мВ. При их взаимодействии с цефтриаксоном наблюдалось постепенное снижение ζ -потенциала формируемого комплекса (табл. 1). Это свидетельствовало об электростатическом взаимодействии между наночастицами хитозан-Ag и цефтриаксоном. Также следует отметить, что при взаимодействии антибиотика с наночастицами хитозан-Ag происходило изменение их гидродинамического диаметра. Так, величина гидродинамического диаметра исходных наночастиц составляла 150 ± 50 нм. При низком

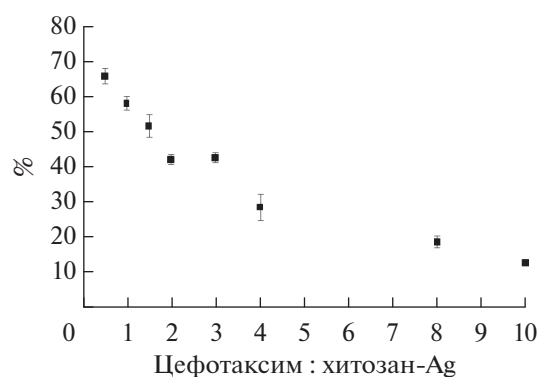


Рис. 3. Эффективность связывания цефотаксима (%) с наночастицами хитозан-Ag в зависимости от соотношения цефотаксим : хитозан-Ag в реакционной смеси.

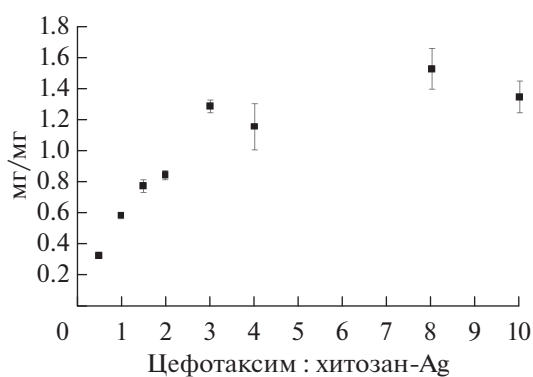


Рис. 4. Содержание цефотаксима (цефотаксим/хитозан-Ag, мг/мг) в полученных комплексах в зависимости от соотношения цефотаксим : хитозан-Ag в реакционной смеси.

содержании цефтриаксона в комплексе наблюдалось некоторое снижение гидродинамического размера (табл. 1), которое могло быть вызвано экранированием зарядов макромолекул хитозана при взаимодействии с противоположно заряженным антибиотиком. При соотношении цефтриаксон : хитозан-Ag в реакционной смеси 1.25 и выше наблюдалось резкое увеличение гидродинамического диаметра и размер частиц комплекса составлял более 1 мкм (табл. 1). В этих условиях достигалась максимальная эффективность связывания антибиотика, и, по-видимому, происходило укрупнение или агрегация частиц.

При смешении хитозан-Ag с цефтриаксоном происходило помутнение раствора и выпадение осадка. В отличие от реакционной смеси цефтриаксон/хитозан-Ag при смешении наноконструкта с цефотаксимом значительного помутнения раствора и выпадения осадка не наблюдалось, то есть происходило образование растворимых комплек-

сов. Как видно на рис. 3 при увеличении соотношения цефотаксим : хитозан-Ag в реакционной смеси от 0.5 до 10 эффективность его связывания снижалась с 66.2 ± 1.5 до $13.0 \pm 0.7\%$.

При этом изменение соотношения с 0.5 до 3 приводило к повышению содержания антибиотика в формируемом комплексе в ~4 раза: с 0.33 ± 0.01 до 1.29 ± 0.03 мг/мг хитозан-Ag (рис. 4). Дальнейшее увеличение концентрации антибиотика в реакционной смеси не оказывало влияние на его содержание в комплексе (рис. 4).

При формировании комплексов хитозан-Ag/цефотаксим происходило снижение величины ζ -потенциала (до 15.5–33.6 мВ) по сравнению с исходными наночастицами (45.4 ± 5.3 мВ), что, как и в случае с цефтриаксоном, подтверждало электростатический характер взаимодействия между компонентами в образуемом комплексе (табл. 2). Гидродинамический диаметр частиц составлял 120–300 нм, при этом они были достаточно одно-

Таблица 1. Характеристики синтезированных комплексов хитозан-Ag/цефтриаксон

Соотношение цефтриаксон : хитозан-Ag (масс.)	ζ -потенциал, мВ	Гидродинамический диаметр, нм	PdI
0.5	35.0 ± 1.3	85 ± 25	0.33 ± 0.01
0.75	26.2 ± 1.2	95 ± 10	0.32 ± 0.11
1.0	39.3 ± 1.8	110 ± 55	0.63 ± 0.08
1.25	36.6 ± 2.1	1300 ± 265	0.72 ± 0.22
1.5	31.8 ± 0.4	1110 ± 215	0.55 ± 0.12
1.75	30.4 ± 1.0	1125 ± 245	0.53 ± 0.11
2.0	24.4 ± 1.8	1610 ± 95	0.44 ± 0.02
3.0	20.9 ± 1.4	2810 ± 585	0.33 ± 0.11
4.0	21.5 ± 1.0	2085 ± 235	0.36 ± 0.08
6.0	12.0 ± 0.2	2275 ± 960	0.32 ± 0.11
8.0	17.5 ± 0.3	1140 ± 55	0.61 ± 0.11

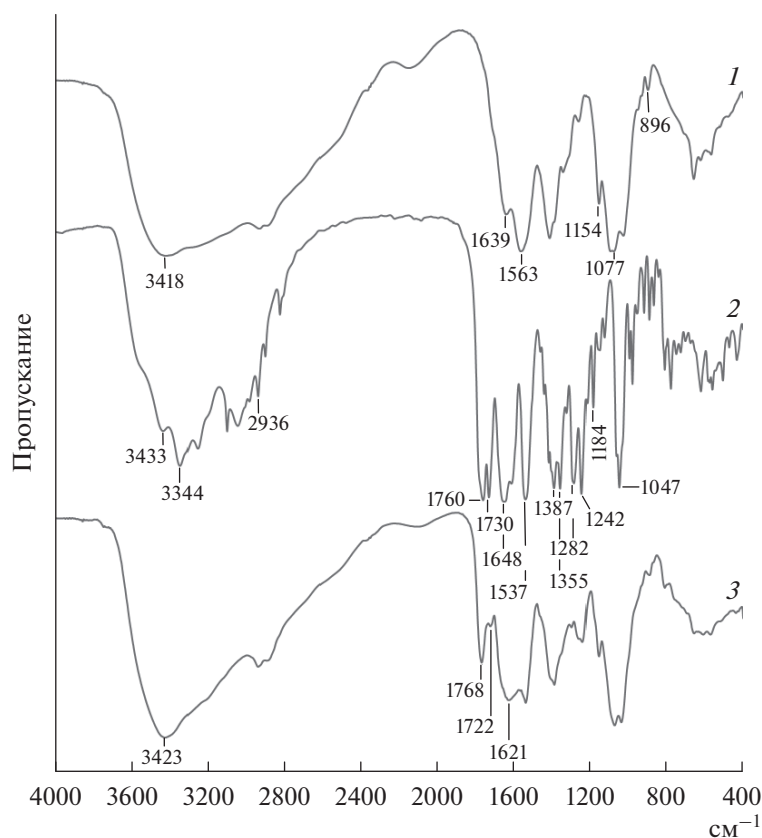


Рис. 5. ИК-спектры наноконпозита хитозан-Ag (1), цефотаксима (2) и комплекса хитозан-Ag/цефотаксим (3).

родными (индекс полидисперсности не превышал 0.50).

Образование комплексов хитозан-Ag/антибиотик подтверждено методом ИК-спектроскопии на примере комплекса хитозан-Ag/цефотаксим. В ИК-спектре наноконпозита хитозан-Ag (рис. 5) присутствовали пики при 3418 (валентные колебания O–H и N–H связей функциональных групп хитозана), 1639 (валентные колебания CONH₂-группы), 1563 (деформационные колеба-

ния $\delta(\text{NH}_2)$), 1154 (валентные асимметричные колебания C–O–C), 1077 (колебания C–O) и 896 см⁻¹ (деформационные колебания C–H глюкопираниозного кольца) [22].

В ИК-спектре цефотаксима (рис. 5) наблюдались характеристические пики при 3433 и 3344 (асимметричные и симметричные валентные колебания N–H и O–H), 2936 (асимметричные валентные колебания CH₃), 1760 и 1730 (валентные

Таблица 2. Характеристики синтезированных комплексов хитозан-Ag/цефотаксим

Соотношение цефотаксим : хитозан-Ag (масс.)	ζ-потенциал, мВ	Гидродинамический диаметр, нм	PdI
0.5	21.8 ± 0.6	220 ± 5	0.41 ± 0.06
1.0	22.3 ± 3.6	250 ± 25	0.37 ± 0.05
1.5	28.4 ± 0.8	260 ± 10	0.35 ± 0.06
2.0	33.2 ± 4.7	280 ± 25	0.47 ± 0.04
3.0	21.9 ± 1.7	120 ± 5	0.28 ± 0.02
4.0	32.0 ± 0.6	300 ± 5	0.42 ± 0.01
6.0	24.5 ± 2.1	250 ± 20	0.39 ± 0.03
8.0	33.6 ± 0.4	190 ± 10	0.28 ± 0.01
10.0	15.5 ± 0.9	160 ± 30	0.33 ± 0.02

Таблица 3. Сравнение антимикробной активности образцов на разных тест-штаммах (микробная нагрузка 2×10^8 кл./мл)

Образец	Зона ингибирования, мм	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Цефотаксим 30 мкг	22	21
Цефотаксим 30 мкг + 0.1 мл хитозан-Ag	23	26
Цефтриаксон 30 мкг	22	25
Цефтриаксон 30 мкг + 0.1 мл хитозан-Ag	23	26

колебания C=O лактамной группировки и эфирной группы), 1648 (валентные колебания C=O амида), 1610 и 1537 (валентные колебания C=C и C=N), 1387 и 1355 (асимметричные и симметричные колебания C—H), 1282 и 1184 (валентные колебания C—N), 1242 (колебания C—N β-лактамного кольца) и 1047 (колебания C—O эфирной группы) [23–26].

В ИК-спектре комплекса хитозан-Ag/цефотаксим (рис. 5) по сравнению с наноккомпозитом хитозан-Ag появились пики при 1768 и 1722 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям C=O β-лактамной группировки и эфирной группы антибиотика. При этом наблюдали смещение этих пиков по сравнению с чистым антибиотиком, что указывает на взаимодействие COO^- групп цефотаксима и аминогруппы хитозан-Ag. Также отсутствовал пик при 1563 см^{-1} , относящийся к колебаниям NH_2 -группы [26, 27].

На формирование системы новых водородных связей указывало смещение полосы колебаний O—H от 3418 до 3423 см^{-1} [26]. Для пика при 1648 см^{-1} (валентные колебания C=O амида) цефотаксима наблюдался сдвиг до 1621 см^{-1} , что свидетельствовало о возможном участии C=O амида во взаимодействии антибиотика с наноккомпозитом хитозан-Ag [28].

Для изучения синергетического потенциала наноккомпозита хитозан-Ag в сочетании с антибиотиками в качестве тест-культур были выбраны грамположительные бактерии *S. aureus* (КМИЭВ В161) и грамотрицательные бактерии *E. coli* (КМИЭВ В88). Антимикробная активность исследованных образцов представлена в табл. 3.

Как видно из таблицы, наибольшую бактерицидную активность хитозан-Ag проявлял в сочетании с цефотаксимом в отношении штамма *E. coli*: зона ингибирования увеличивалась в 1.24 раза при добавлении к диску с антибиотиком аликвоты наноккомпозита. На грамположительные бактерии *S. aureus* выраженного синергетического действия наноккомпозита хитозан-Ag с исследованными антибиотиками не выявлено.

В связи с этим антимикробную активность по отношению к различным тест-штаммам изучали

для комплексов хитозан-Ag/цефотаксим. При изучении антимикробной активности полученных образцов использовали резистентные к цефотаксиму штаммы. Различное антимикробное действие антибиотика на изоляты № 2 и 5 *E. coli*, а также № 3 и 7 *S. aureus* может быть связано с различной чувствительностью указанных штаммов. Комплексы хитозан-Ag/цефотаксим, полученные при соотношении антибиотик : хитозан-Ag 1 : 1 и 2 : 1 (образцы № 3 и 4), не проявляли антимикробное действие против штаммов № 2 *E. coli* и № 7 *S. aureus*, в то время как комплекс хитозан-Ag/цефотаксим, полученный при соотношении антибиотик : хитозан-Ag 4 : 1 (образец № 5), подавлял рост указанных тест-культур (табл. 4). Это можно объяснить тем, что содержание цефотаксима в комплексе, полученном при соотношении 4:1, выше, чем в других комплексах (рис. 4), что было причиной более слабого взаимодействия антибиотика с хитозан-Ag и его свободной диффузии в агар. В случае комплексов, полученных при соотношениях 1 : 1 и 2 : 1, цефотаксим более прочно связан с хитозан-Ag, что затрудняло его высвобождение в питательную среду.

Следует отметить, что для комплексов хитозан-Ag/цефотаксим (образцы № 3–5) по сравнению с чистым антибиотиком (образец № 2) наблюдалось уменьшение зон задержки роста бактерий либо их отсутствие, за исключением изолята № 4 *P. vulgaris* (табл. 4). Возможно, это связано с меньшей скоростью диффузии антибиотика в комплексе с хитозаном по сравнению с нативным антибиотиком.

Аналогичные результаты по антимикробной активности комбинаций наночастиц серебра с бета-лактамными антибиотиками были получены в ряде работ. Так, в работе [29] авторы показали, что комбинирование наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном, с бета-лактамными антибиотиками (биапенемом, азтреонамом, ампициллином) не приводило к увеличению антимикробной активности по отношению к штаммам *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* и *S. aureus*. Авторы [30] отмечали, что комбинация наночастиц Ag с цефтриаксоном проявляла улучшенные антибактериальные свойства против *E. coli*. Диаметр зоны

Таблица 4. Сравнение антимикробной активности образцов на разных тест-штаммах (2×10^8 кл./мл)*

Тест-культура, изолят	Зона задержки роста, мм					
	Цефотаксим, 30 мкг	Наноккомпозит хитозан-Ag	образец			
			№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
№ 1 <i>P. aeruginosa</i>	14	10	10	—	—	—
№ 2 <i>E. coli</i>	21	11	21	—	—	17
№ 3 <i>S. aureus</i>	17	8	17	8	8	14
№ 4 <i>P. vulgaris</i>	15	8	8	8	8	9
№ 5 <i>E. coli</i>	—	11	—	—	—	—
№ 6 <i>S. agalactiae</i>	—	10	—	—	—	—
№ 7 <i>S. aureus</i>	14	10	14	—	—	13

* “—” Зона задержки роста отсутствует.

ингибирования увеличивался по сравнению с исходными наночастицами и чистым антибиотиком в 1.76 и 1.29 раз соответственно. В отношении штамма *S. aureus* указанные комбинации антибактериальных свойств не проявляли. В этой же работе авторы показали, что комбинирование наночастиц серебра с цефазолином, который также относится к цефалоспорином, не приводило к изменению антибактериальной активности по отношению к *E. coli* и *S. aureus* по сравнению с чистым антибиотиком.

Одной из препаративных форм, удобной для практического использования и хранения, являются порошки. Лиофилизированные порошки комплекса хитозан-Ag/цефотаксим, легко диспергируемые в воде, получены методом сублимационной сушки. Установлено, что лиофильное высушивание не оказывало существенного влияния на ζ -потенциал, гидродинамический диаметр и полидисперсность комплексов хитозан-Ag/цефотаксим.

*

Методом “зеленой химии” путем химического восстановления нитрата серебра хитозаном синтезированы агрегативно устойчивые положительно заряженные наноккомпозиты хитозан-Ag. Получены комплексы хитозан-Ag/цефтриаксон и хитозан-Ag/цефотаксим, содержащие до 1.06 ± 0.01 и 1.29 ± 0.03 мг антибиотика/1 мг хитозан-Ag соответственно.

Наибольшую бактерицидную активность хитозан-Ag проявлял в сочетании с цефотаксимом в отношении штамма *E. coli*: зона ингибирования увеличивалась в 1.24 раза. Выявленного синергетического действия наноккомпозита хитозан-Ag с исследованными антибиотиками в отношении грамположительных бактерий *S. aureus* не выявлено. Установлена эффективность применения комплек-

са хитозан-Ag/цефотаксим к резистентным изоляту № 2 *E. coli*, изолятам № 3 и 7 *S. aureus*.

Полученные комплексы наноккомпозита хитозан-Ag и цефотаксима являются перспективными материалами для биомедицинского применения и ветеринарии при лечении различных бактериальных инфекций.

Работа была выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор X20СРБГ-002) и гранта № 337-00-00612/2019-09/02.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uddin T.M., Chakraborty A.J., Khusro A., Zidan R.M., Mitra S., Emran T.B. et al. // J. Infection and Public Health. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
2. Pau M.K., Конь Е.В. // Сучасні аспекти військової медицини. 2011. № 18. С. 545–550.
3. Allahverdiyev A.M., Kon K.V., Abamor E.S., Bagirova M., Rafailovich M. // Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2011. V. 9. № 11. P. 1035–1052.
4. Deng H., McShan D., Zhang Y., Sinha S.S., Arslan Z., Ray P.C., Yu H. // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 8840–8848.
5. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Y., Lisichkin G.V. // Russ. Chem. Rev. 2008. V. 77. P. 233–257.
6. Букина Ю.А., Сергеева Е.А. // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. С. 170–172.
7. Li W.R., Xie X.-B., Shi Q.-S., Zeng H.-Y., Ou-Yang Y.-S., Chen Y.-B. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 4. P. 1115–1122.
8. Li Y., Hindi K., Watts K.M., Taylor J.B., Zhang K., Li Z., Hunstad D.A., Cannon C.L., Youngs W.J., Wooley K.L. // Chemical Communications. 2010. V. 46. № 1. P. 121–123.
9. Shanmuganathan R., MubarakAli D., Prabakar D., Muthukumar H., Thajuddin N., Kumar S.S., Pugazhen-

- dhi A.* // Environmental Science and Pollution Research. 2018. V. 25. № 11. P. 10362–10370.
10. *Harshiny M., Matheswaran M., Arthanareeswaran G., Kumaran S., Rajasree S.* // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015. V. 121. P. 135–141.
 11. *Shah M. R., Ali S., Ateeq M., Perveen S., Ahmed S., Bertinoc M.F., Alib M.* // New J. Chemistry. 2014. V. 38. № 11. P. 5633–5640.
 12. *Hassan M.H.A., Ismail M.A., Moharram A.M., Shoreit A.* // Am. J. Microbiol. Res. 2016. V. 4. P. 132–137.
 13. *Ahmed V., Kumar J., Kumar M., Chauhan M.B., Vij M., Ganguli M., Chauhan N.S.* // J. Biotechnology. 2013. V. 163. № 4. P. 419–424.
 14. *Ketikidis I., Banti C.N., Kourkoumelis N., Tsiafoulis C.G., Papachristodoulou C., Kalampounias A.G., Hadjikakou S.K.* // Antibiotics. 2020. V. 9. № 1. P. 25.
 15. *Ohanyan S.A., Rshuni L.R., Grabski H.V., Tiratsuyan S.G., Hovhannisyanyan A.A.* // Biological J. Armenia. 2019. V. 71. № 3. P. 89–96.
 16. *Li P., Li J., Wu C., Wu Q., Li J.* // Nanotechnology. 2005. V. 16. № 9. P. 1912–1917.
 17. *Biao L., Tan S., Wang Y., Guo X., Fu Y., Xu F., Zu Y., Liu Z.* // Mater. Sci. Eng. C. 2017. V. 76. P. 73–80.
 18. *Гилевская К.С., Машкин М.Е., Красковский А.Н., Кабанова О.В., Степанова Е.А., Кузьминский И.И., Куликовская В.И., Агабеков В.Е.* // Журн. неорг. химии. 2021. Т. 66. № 8. С. 1017–1024.
 19. *Verlee A., Mincke S., Stevens C.V.* // Carbohydr. Polym. 2017. V. 164. P. 268–283.
 20. *Abioye A., Sanyaolu A., Dudzinska P., Adepoju-Bello A.A., Coker H.A.B.* // Pharm. Nanotechnol. 2020. V. 8. № 1. P. 33–53.
 21. *Duceac L.D., Calin G., Eya L., Marcu C., Goroftei E.R.B., Dabija M.G. et al.* // Materials (Basel). 2020. V. 13. № 21. P. 4792.
 22. *Kulikouskaya V., Zhdanko T., Hileuskaya K., Kraskouski A., Zhura A., Skorohod H., Butkevich V., Kunal Pal, Tratsyak S., Agabekov V.* // J. Biomedical Materials Research Part A. 2021. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37278>
 23. *Gunasekaran S., Charles J.* // Asian J. Chemistry. 2008. V. 20. № 2. P. 1343–1356.
 24. *Consorti L.P., Salgado H.R.N.* // J. Pharm. Sci. Emerg. Drugs. 2017. V. 5. № 1. <https://doi.org/10.4172/2380-9477.1000118>
 25. *Kusumaningrum S., Arbianto A.D., Rismana E., Firdayani, Jannah R.* // Research J. Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2020. V. 11. № 1. P. 24–31.
 26. *Li Z., Wang X., Zhang X., Yang Y., Duan J.* // Chemical Engineering J. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127494>
 27. *Mudarisova R.Kh., Kulish E.I., Zinatullin R.M., Tamindarova N.E., Kolesov S.V., Khunafin S.N., Monakova Yu.B.* // Russian J. Applied Chemistry. 2006. V. 79. P. 1210–1212.
 28. *Halawani E.M., Hassan A.M., El-Rab S.M.F.G.* // International J. Nanomedicine. 2020. V. 15. P. 1889–1901.
 29. *Vazquez-Muñoz R., Meza-Villezcás A., Fournier P.G.J., Soria-Castro E., Juárez-Moreno K., Gallego-Hernández A. L., Bogdanchikova N., Vazquez-Duhalt R., Huerta-Saqueró A.* // PLoS One. 2019. V. 14. № 11. e0224904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904>
 30. *Новикова Г.В., Воробьев С.А., Шидловский И.П.* // Омские научные чтения – 2018. Материалы Второй Всероссийской научной конференции. Омск: Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, 2018. С. 847–849.

Preparation and Properties of Complexes Based on Chitosan-Ag Nanocomposite and Cephalosporin Antibiotics

A. N. Kraskouski^{a,*}, V. V. Nikalaichuk^a, K. S. Hileuskaya^a, V. I. Kulikouskaya^a, E. A. Stepanova^b, I. I. Kuzminski^b, N. Opavski^c, and V. E. Agabekov^a

^a Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus

^b Institute of experimental veterinary medicine named after S.N. Vysheslesky, Minsk, 220063 Republic of Belarus

^c University of Belgrade, Belgrade, 11000 Republic of Serbia

*e-mail: aleks.kraskovsky@gmail.com

Aggregative stable positively charged (~45 mV) chitosan-Ag nanocomposites with spherical shape and size up to 60.0 nm were synthesized by the “green chemistry” method by chemical reduction of silver nitrate with chitosan. Chitosan-Ag/ceftriaxone and chitosan-Ag/cefotaxime complexes, containing up to 1.06 ± 0.01 and 1.29 ± 0.03 mg antibiotic/mg chitosan-Ag respectively were obtained. It was found that with an increase in the ceftriaxone : chitosan-Ag mass ratio in the reaction mixture from 0.5 to 1.25, the efficiency of antibiotic binding to nanoparticles increases from 7.2 ± 0.2 to $71.7 \pm 0.2\%$, and with an increase in the cefotaxime : chitosan-Ag ratio in the reaction mixture from 0.5 to 10 the antibiotic binding efficiency decreases from 66.2 ± 1.5 to $13.0 \pm 0.7\%$. The formation of chitosan-Ag/antibiotic complexes was confirmed by IR spectroscopy. The effectiveness of the use of the chitosan-Ag/cefotaxime complexes against antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was established.

Keywords: chitosan, silver, nanocomposite, hydrothermal synthesis, antibiotic, antimicrobial activity