

# ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВИСМУТСОДЕРЖАЩИХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ

*[Л. Г. Бурова](#)<sup>1</sup>, [Ю. М. Юхин](#)<sup>2</sup>, [Л. А. Герлинская](#)<sup>3</sup>, [А. Н. Евстропов](#)<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт химии твердого тела и механохимии» СО РАН (г. Новосибирск)

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт цитологии и генетики» СО РАН (г. Новосибирск)

Изучены антибактериальные свойства висмутсодержащих субстанций в отношении условно-патогенных бактерий *in vitro*. Определялись МИК и МБК. Показатели антимикробной активности оригинальной висмутсодержащей субстанции, полученной на основе наночастиц, оказались достоверно выше по сравнению с результатами изучения препарата Де-Нол. Антимикробные свойства оригинальной висмутсодержащей субстанции в отношении *S. aureus* были усилены путем ее комбинирования с экстрактами коры крушины и корневища аира.

*Ключевые слова:* наночастицы, висмутсодержащие субстанции, антибактериальная активность, *E. coli*, *S. aureus*.

---

**Бурова Любовь Георгиевна** — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: +7 (383) 222-68-35, e-mail: mic.bio.lgb@mail.ru

**Юхин Юрий Михайлович** — доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт химии твердого тела и механохимии», рабочий телефон: +7 (383) 336-38-39, e-mail: Yukhin@solid.nsc.ru

**Герлинская Людмила Алексеевна** — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии и генетики», рабочий телефон: +7 (383) 333-41-14, e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

**Евстропов Александр Николаевич** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», рабочий телефон: +7 (383) 222-68-35, e-mail: microbio@ngs.ru

*Введение.* В настоящее время возрастает значимость проблемы нозокомиальных инфекций в патологии человека и их роли в развитии и исходах инфекционного процесса, особенно в связи с формированием антибиотикорезистентности микроорганизмов [1]. Поэтому остаются актуальными поиск и разработка новых антибактериальных средств. Перспективным направлением в решении этой проблемы является применение нанобиотехнологий, направленных на совершенствование специфических свойств наночастиц металлов, определяемых их структурной модификацией, что позволяет достигать различных биологических эффектов, в том числе и антибактериальных.

Комплексный анализ, включающий определение физико-химических характеристик, исследование субклеточных и клеточных реакций *in vitro* и изучение морфологических и иммунофизиологических процессов, развивающихся на уровне организма, лежит в основе прогнозирования потенциальных биологических эффектов наночастиц [2]. Производство и использование наночастиц растет, в том числе и при создании новых лекарственных препаратов. В ИХТТМ СО РАН разработан экологически безопасный способ получения растворов солей висмута с высокой степенью очистки от примесей тяжелых металлов. Исследованы физико-химические свойства потенциально новой фармакологической субстанции на основе наноразмерного цитрата висмута, и разработан способ получения растворов цитрата висмута диапазона высокой концентрации. Проведенные исследования свидетельствуют, что молярное отношение ионов висмута к цитрат-ионам, ионам калия и аммония в субстанции препарата Де-Нол Astellas Pharma Europe B.V. составляет соответственно 1,0 : 1,40 : 1,80 : 1,22. Исходя из этого состав субстанции может быть представлен в следующем виде:



где  $x = 3,2-4,2$ ;  $a y = 0,8-1,8$  с содержанием активного компонента в пересчете на оксид висмута 38,5–42,0 %. Исследование растворимости цитрата висмута состава  $\text{Bi}_6\text{H}_5\text{O}_7$  в воде показало, что концентрация висмута в растворе составляет 0,011 г/л. В случае висмут трикалия дicitрата состава  $\text{BiK}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$  она составляет 1,4 г/л, а в случае коллоидного субцитрата висмута — 400 г/л и плотностью 1,70 г/см<sup>3</sup>. Таким образом, присутствие в субстанции цитратов калия и аммония способствует, при ее растворении в воде, образованию в растворе коллоидного субцитрата висмута. Разработана фармакопейная статья на Висмут трикалия дicitрат, которая направлена в Министерство здравоохранения и социального развития РФ для регистрации. Данное соединение, в соответствии с Распоряжением Правительства РФ от 30 декабря 2009 года № 2135-р, внесено в Перечень 57-ми жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств России для импортозамещения. Отрабатываются методы синтеза наночастиц медпрепаратов на основе висмута, а также комбинированных систем на носителях различной природы с целью получения биокомпозитов. С целью разработки лекарственного средства с использованием отечественных вспомогательных ингредиентов исследуется возможность получения и нарабатываются опытные образцы наночастиц висмут-, калий-, аммоний цитрата в результате нанесения их на кукурузный или картофельный крахмал, метилцеллюлозу и микрокристаллическую целлюлозу [3].

*Цель исследования:* изучение антибактериального эффекта висмутсодержащих субстанций на основе наночастиц в отношении условно-патогенных бактерий.

*Материалы и методы.* Для исследования использовались следующие вещества,

полученные в ИХТТМ СО РАН:

1. потенциальная лекарственная субстанция висмута трикалия дицитрата (коллоидного субцитрата висмута) — далее — оригинальная висмутсодержащая субстанция (ОВСС) —  $[\text{Bi}_6(\text{OH})_6(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_4] \cdot 3,6\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 0,8(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  с молекулярной массой — 3410. Присутствие в субстанции цитратов калия и аммония способствует, при растворении ее в воде, образованию коллоидных растворов, содержащих наночастицы висмут-, калий-, аммоний цитрата с размером частиц 2,0–3,0 нм. Концентрация коллоидного субцитрата висмута при растворении в воде может достигать 1,1 г/мл. Субстанция содержит не менее 34,5 % и не более 37,7 % висмута, не менее 11,6 % и не более 13,0 % калия, не менее 42,0 % и не более 46,0 % цитрата;
2. масса 1-й таблетки лекарственного средства Де-Нол Astellas Pharma Europe B.V. составляет 0,44 г, масса активной субстанции в 1-й таблетке составляет 0,305 г;
3. проба с крахмалом содержит 79 % оригинальной субстанции и 21 % крахмала (ОВССК);
4. проба с крахмалом, корой крушины и корневищем аира содержит 70 % оригинальной субстанции и 30 % вспомогательных веществ (ОВССФ).

Дозы веществ рассчитаны следующим образом: Де-Нол — 1 таблетка соответствует 305 мг активного вещества. Оригинальный субцитрат висмута принят за активное вещество. Проба с крахмалом — пересчитана на 79 % активной субстанции. Проба с фитокомпозицией — пересчитана на 70 % активной субстанции. Испытуемые субстанции вносились по 1000, 500, 250, 125 и 62,5 мкг активного вещества в 1 мл питательного бульона.

В работе использованы следующие микроорганизмы: *E. coli* У13, *E. coli* 25 Ц 22 АТСС, *S. aureus* 209 из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО НГМУ. Посевная доза бактерий определялась с использованием стандарта мутности по Mc Farland и соответствовала  $10^3$  микробных клеток, вносимых в объеме 0,1 мл. Инкубация производилась при 37 °С — 24 часа. После инкубации при просмотре посевов определялась минимальная бактериостатическая (ингибирующая) концентрация (МИК) — минимальная эффективная доза, соответствующая отсутствию видимого роста. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принималась доза вещества в пробе, при дальнейшем высеве которой по 0,1 мл на плотную питательную среду роста не наблюдалось. Дозы веществ выше 1000 мкг/мл не рассматривались ввиду их малой растворимости. Инкубация производилась при 37° С — 24 часа [4]. Результаты анализировались с использованием программы Statistika 12. Для показателей МИК и количества колониеобразующих единиц были рассчитаны значения средних величин и стандартного отклонения. Достоверность различий определялась по критерию Стьюдента и определялась значениями  $P < 0,05$ .

*Результаты исследований.* Проведенные исследования показали бактериостатическое действие изучаемых субстанций. Де-Нол подавлял рост культуры *E. coli* 25 Ц 22 АТСС в дозе  $800 \pm 273,9$  мкг/мл. Оригинальная субстанция задерживала рост *E. coli* У13, *E. coli* 25 Ц 22 АТСС и *S. aureus* 209 соответственно в меньших концентрациях —  $700 \pm 273,9$ ;  $112,4 \pm 28,17$  и  $850 \pm 269,3$  мкг/мл. Субстанция с крахмалом вызывала видимую задержку роста тех же культур в дозах  $900 \pm 223,6$ ;  $112,4 \pm 28,17$  и  $950 \pm 213,8$  мкг/мл соответственно. И субстанция с фитокомпозицией проявляла бактериостатические свойства в отношении *E. coli* 25 Ц 22 АТСС и *S. aureus* 209 соответственно в дозах  $450,0 \pm 111,8$  и  $470,0 \pm 115,6$  мкг/мл (см. табл.).

### **Определение бактериостатической активности висмутсодержащих субстанций**

Исследуемые вещества МИК (мкг/мл)	Де-Нол	ОВСС	ОВССК	ОВССФ
E. coli Y13	> 1000	700,0 ± 273,9*	900,0 ± 223,6	> 1000
E. coli 25 Ц 22 АТСС	800,0 ± 273,9	112,4 ± 28,17*	112,4 ± 28,17*	450,0 ± 111,8*
S. aureus 209	> 1000	850,0 ± 269,3	950,0 ± 213,8	470,0 ± 115,6*

Примечание: \* — различия по отношению препарата Де-Нол достоверны при  $P < 0,05$

При высеве проб, полученных при культивировании на питательном бульоне на плотную питательную среду, получились следующие результаты в отношении культуры E. coli Y13: для Де-Нола — торможение роста в дозе 1000 мкг/мл до  $28000 \pm 8369$  КОЕ; для ОВСС — отсутствие роста в МБК =  $950 \pm 215,6$  мкг/мл и снижение роста культуры до  $158 \pm 8,37$  КОЕ в дозе 500 мкг/мл, что достоверно отличалось от официального препарата; для ОВССК — снижение роста в дозе 1000 мкг/мл до  $200,00 \pm 61,24$  КОЕ и в дозе 500 мкг/мл — до  $23000 \pm 6708$  КОЕ; ОВССФ снижал рост культуры в дозе 1000 мкг/мл до  $14000 \pm 4183$  КОЕ. Динамика снижения роста показана на рис. 1.

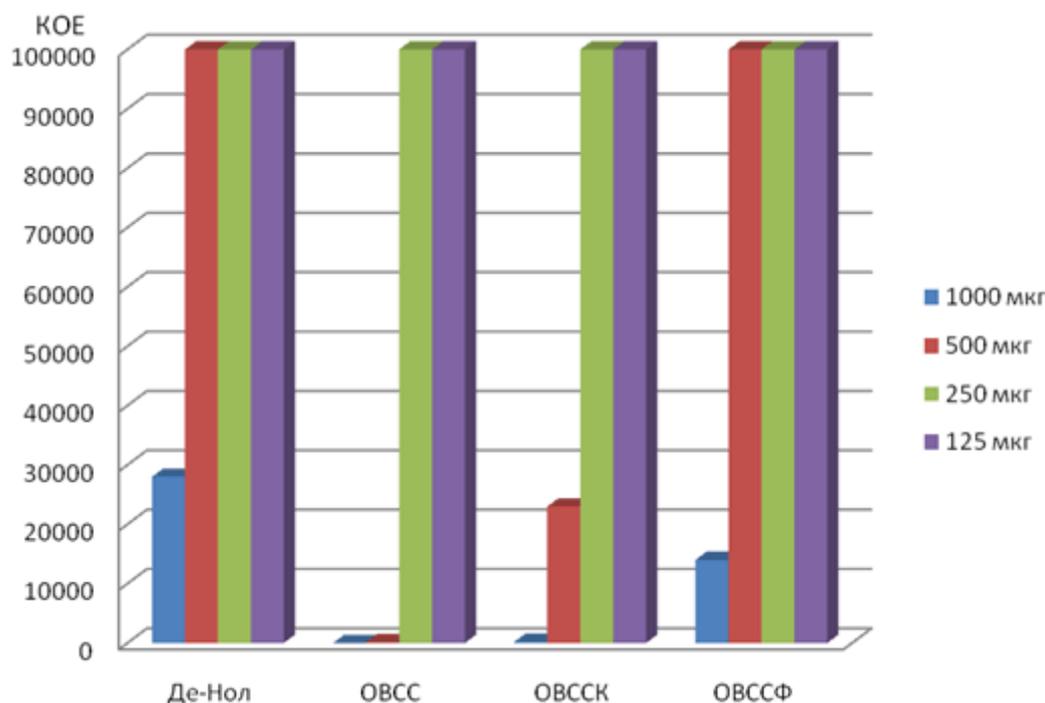


Рис. 1. Динамика подавления роста E. coli Y13 висмутсодержащими субстанциями

В отношении культуры E. coli 25 Ц 22 АТСС субстанции оказались более активны. Торможение роста бактерий наблюдалось в меньших дозах (рис. 2).

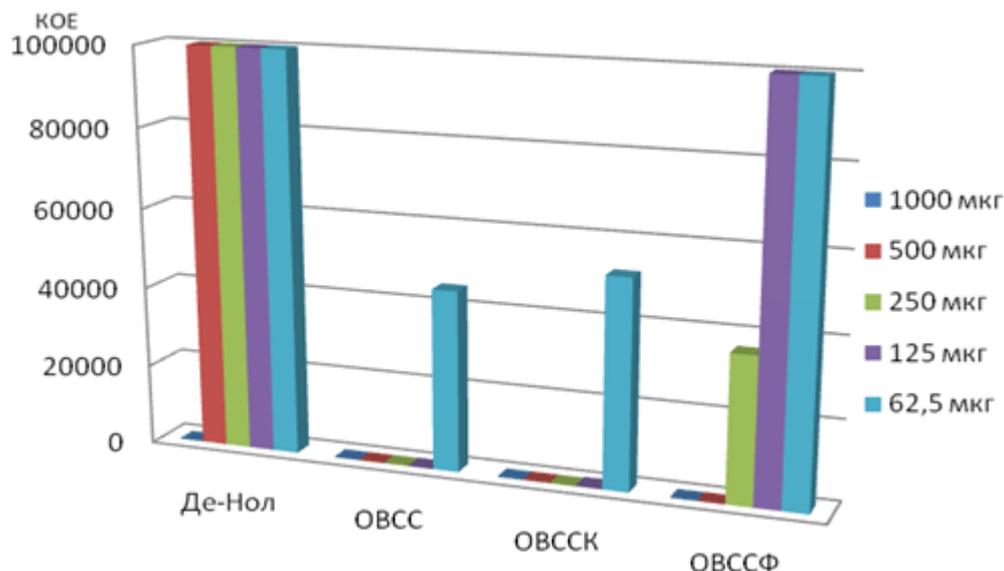


Рис. 2. Динамика подавления роста *E. coli* 25Ц22АТСС висмутсодержащими субстанциями

Де-Нол подавлял рост культуры до  $42,00 \pm 8,37$  КОЕ в дозе 1000 мкг/мл; оригинальная субстанция подавляла рост в МБК =  $281,0 \pm 157,3$  мкг/мл до  $54,0 \pm 11,4$  КОЕ и  $45000 \pm 5000$  КОЕ соответственно в дозах 125 и 62,5 мкг/мл, что достоверно отличалось от активности препарата Де-Нол. Субстанция с крахмалом показала МБК =  $350,0 \pm 136,9$  мкг/мл, а рост культуры снижала до  $220,00 \pm 37,01$  КОЕ и  $52000 \pm 8367$  КОЕ в концентрациях 125 и 62,5 мкг/мл. ОВССФ проявила МБК =  $450,0 \pm 111,8$  мкг/мл и снизила рост бактерий до  $36400 \pm 8944$  КОЕ (рис. 2).

Динамику подавления роста культуры *S. aureus* 209 отражает рис. 3. Препарат Де-Нол в использованных дозах не подавлял рост стафилококковой культуры. ОВСС снижала показатель до  $92,0 \pm 8,367$  КОЕ в дозе 1000 мкг/мл. ОВССК в той же дозе уменьшал рост до  $94,0 \pm 5,47$  КОЕ.

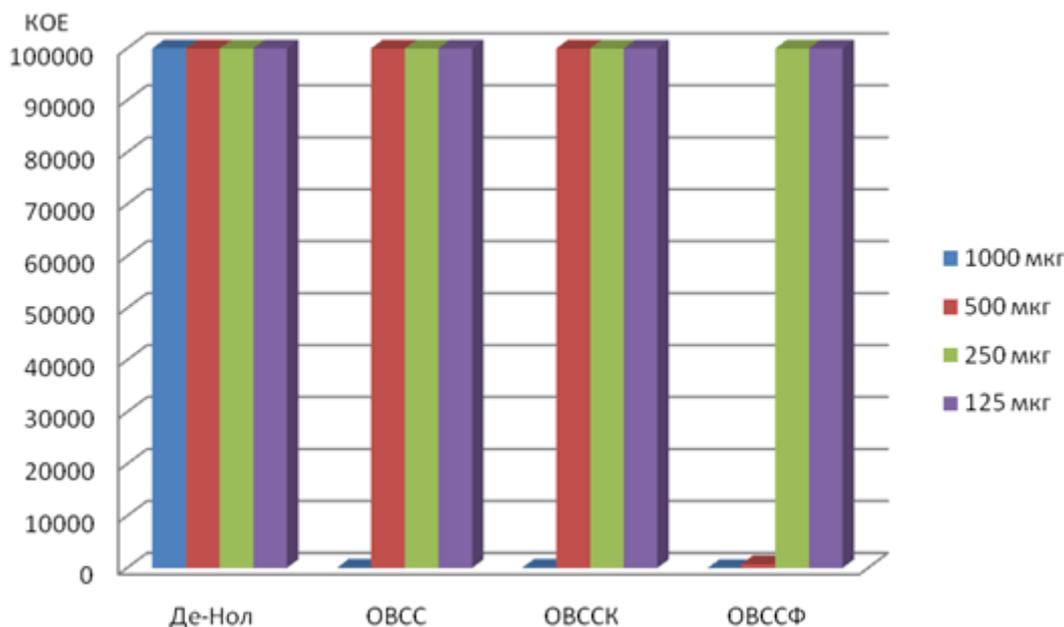


Рис. 3. Динамика подавления роста *S. aureus* 209 висмутсодержащими субстанциями

Субстанция с фитокомплексом показала активность в МБК =  $900 \pm 223,6$  мкг/мл, а в дозе 500 мкг/мл снижала рост культуры до  $780,0 \pm 83,67$  КОЕ, что достоверно эффективнее

в отличие от результатов антибактериального действия других субстанций в тех же дозах. В дозе 1000 мкг/мл оригинальная субстанция и ее производные показали достоверно большую активность по отношению к препарату Де-Нол.

*Обсуждение результатов.* Особые физико-химические свойства, обусловленные сверхмалыми размерами наночастиц, способны вызывать биологические эффекты, принципиально отличные от эффектов «макроформы» материалов идентичной химической структуры. Биологические эффекты наночастиц определяются их формой, величиной поверхностного заряда, растворимостью в биологических средах, химической реактивностью и другими свойствами [2]. Эти характеристики позволяют объяснить возможность более эффективного антибактериального действия наноразмерных висмутсодержащих субстанций по сравнению с официальным препаратом Де-Нол.

Проблема чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам на сегодняшний день воспринимается неоднозначно. Для ее успешного решения необходимо учитывать различные аспекты, в том числе особенности генетической изменчивости, эволюции взаимоотношений микроорганизмов, их приспособительные внутри- и межвидовые реакции [5]. Так, в представленной работе на примере исследования висмутсодержащих субстанций отмечены отличающиеся данные по активности препаратов в отношении двух штаммов *E. coli*. Представляет интерес изучение спектра антимикробной активности среди клинических изолятов, выделенных при разной патологии.

Неугасающий интерес вызывают вещества растительного происхождения [6, 7]. Их активность характеризуется многообразием биологических эффектов и механизмов действия. Антимикробные свойства оригинальной висмутсодержащей субстанции могут быть усилены ее комбинированием с другими потенциально активными веществами, в том числе растительного происхождения. В то же время, совместное действие различных препаратов могут приводить как к усилению эффекта, так и к его угнетению или нейтрализации. В исследовании отмечено достоверное усиление антибактериальной активности оригинальной субстанции в отношении *S. aureus* при комбинации ее с фитокомпозицией, содержащей экстракты коры крушины и корневища айра.

Таким образом, висмутсодержащие субстанции, полученные на основе наночастиц, позволяют рассматривать их как потенциально перспективные антимикробные препараты для дальнейшего изучения.

#### *Выводы*

1. Выявлена антибактериальная активность висмутсодержащих субстанций в отношении условно-патогенных бактерий. Результаты неоднородны и могут меняться в зависимости от используемого штамма микроорганизмов.
2. Показатели антимикробной активности оригинальной висмутсодержащей субстанции оказались выше по сравнению с препаратом Де-Нол.
3. Антимикробные свойства оригинальной висмутсодержащей субстанции в отношении *S. aureus* были усилены путем ее комбинирования с экстрактами коры крушины и корневища айра, что проявилось снижением показателя МИК.

#### *Список литературы*

1. Яковлев С. В. Обоснование антибактериальной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами / С. В. Яковлев, М. П. Суворова // Клин. фармакология и терапия. — 2011. — № 2. — С. 24-34.

2. Аттестация и применение наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов / И. П. Арсентьева [и др.] // Нанотехника. Спец. вып. «Нанотехнологии-медицине». — 2007. — № 2 (10). — С. 72-77.
3. Синтез соединений висмута для медицины / Ю. М. Юхин [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. — 2004. — Т. 12. — С. 401-408.
4. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. — М. : Медицина, 2005. — С. 515-522.
5. Супотницкий М. В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М. В. Супотницкий // Биопрепараты. — 2011. — № 2. — С. 4-11.
6. Хаджиева З. Д. Изучение антимикробной активности лекарственных препаратов с фитоэкстрактом / З. Д. Хаджиева, Е. А. Теунова, И. С. Крахмалев // Фундаментальные исследования. — 2010. — № 11. — С. 152-154.
7. Антимикробное и иммуномодулирующее действие ресвератрол-содержащих растительных экстрактов / О. Л. Коротина [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2013. — № 3. — С. 10-21.

# RESEARCH OF BISMUTH SUBSTITUTED ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SUBSTANCES ON THE BASIS OF NANOPARTICLES

*L. G. Burova<sup>1</sup>, Y. M. Yukhin<sup>2</sup>, L. A. Gerlinskaya<sup>3</sup>, A. N. Evstropov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)*

<sup>2</sup>*FSBSE «Institute of chemistry of solids and mechanochemistry» SB RAS (Novosibirsk)*

<sup>3</sup>*FSBSE «Institute of cytology and genetics» SB RAS (Novosibirsk)*

Antibacterial properties of bismuth substituted substances concerning opportunistic bacteria in vitro are studied. MIC and MMC were defined. Indicators of antimicrobial activity of the original bismuth substituted substance received on the basis of nanoparticles were authentically higher in comparison with results of studying of De-Nol medicine. Antimicrobial properties of original bismuth substituted substance concerning *S. aureus* were increased by its combination with extracts of buckthorn cortex and rhizome of *acorus*.

**Keywords:** nanoparticles, bismuth substituted substances, antibacterial activity, *E. coli*, *S. aureus*.

---

## **About authors:**

**Burova Lyubov Georgiyevna** — candidate of medical sciences, assistant of microbiology, virology and immunology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 222-68-35, e-mail: mic.bio.lgb@mail.ru

**Yukhin Yury Mikhaylovich** — doctor of chemical science, professor, chief researcher at FSBSE «Institute of chemistry of solids and mechanochemistry» SB RAS, office phone: +7 (383) 336-38-39, e-mail: Yukhin@solid.nsc.ru

**Gerlinskaya Lyudmila Alekseevna** — doctor of biological science, leading researcher at FGBUN «Institute of a cytology and genetics», office phone: +7 (383) 333-41-14, e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

**Evstropov Alexander Nikolaevich** — doctor of medical science, professor, head of microbiology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», office phone: 8 (383) 222-68-35, e-mail: microbio@ngs.ru

## **List of the Literature:**

1. Yakovlev S. V. Justification of antibacterial therapy nosocomial of infections caused by polyrefractory microorganisms / S. V. Yakovlev, M. P. Suvorova // Clin. pharmacology and therapy. — 2011. — N 2. — P. 24-34.
2. Certification and application of nanoparticles of metals as biologically active preparations / A. P. Arsentyeva [et al] // Nanoequipment special edition. «Nanotechnologies medicine». — 2007. — N 2 (10). — P. 72-77.

3. Synthesis links of bismuth for medicine / Y. M. Yukhin [etc.] // Chemistry in interests of sustainable development. — 2004. — V. 12. — P. 401-408.
4. Habriyev R. U. Guidance on experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances / R. U. Khabriyev. — M.: Medicine, 2005. — P. 515-522.
5. Supotnitsky M. V. Mechanisms of development of resistance to antibiotics at bacteria / M. V. Supotnitsky // Biological preparations. — 2011. — N 2. — P. 4-11.
6. Hadzhiyeva Z. D. Studying of antimicrobial activity of medicinal preparations with phytoextract / Z. D. Hadzhiyeva, E. A. Teunov, I. S. Krakhmalev // Basic researches. — 2010. — N 11. — P. 152-154.
7. Antimicrobial and immunomodulatory action resveratrol substituted plant extracts / O. L. Korotina [etc.] // Immunopathology, allergology, infectology. — 2013. — N 3. — P. 10-21.