

МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ

УДК 544.22, 547.793, 579.61

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОЗИЦИОННЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ
В СИСТЕМЕ ПОЛИ-N-ВИНИЛПИРРОЛИДОН– $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$
(RE – ИОНЫ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ)

© 2020 г. Г. М. Кузьмичева^{1,*}, О. И. Тимаева², Н. Н. Новикова², С. Н. Якунин², А. В. Рогачев²,
Р. Д. Светогоров², И. И. Пашкин¹, Р. П. Терехова³

¹ МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³ Институт хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: galina_kuzmicheva@list.ru

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 09.06.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Представлены результаты изучения и анализа бактерицидных и бактериостатических свойств (в темноте) солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ ($RE = La, Ce, Gd, Yb, Y$) и композиционных гидрогелей с поли-N-винилпирролидоном по отношению к бактериям *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* и грибам *Candida albicans*. Предложены корреляционные связи зоны задержки роста микроорганизмов с характеристиками объектов. Продемонстрированы на упорядоченных фосфолипидных монослоях (модель биологических мембран) механизмы взаимодействия с клеточной оболочкой бактерий ионов Yb^{3+} соли $Yb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, обладающей высокой антимикробной активностью по отношению к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

DOI: 10.31857/S0023476120060211

ВВЕДЕНИЕ

В отечественной и зарубежной литературе имеется большое количество публикаций, посвященных разработке перспективных подходов к преодолению резистентности микроорганизмов за счет вновь разработанных и синтезированных альтернативных средств с высокой антимикробной активностью. К таким объектам относятся соединения с редкоземельными ионами (RE), которые входят в виде добавок в составы противовоспалительных, регенерирующих, обезболивающих, ранозаживляющих, антимикробных мазей и препаратов, таких как Эплан (регистрационное удостоверение RU.77.99.21.001.E.002989.02.12), “Кожная броня”, Вилпран, Лантанол [1–5].

Кроме того, соединения с RE используются в профилактической медицине (гидроксиапатит, допированный ионами $RE = Gd^{3+}, Yb^{3+}/Tm^{3+}, Eu^{3+}$, для диагностики на основе мультимодальной визуализации) [6], в качестве 3D-скаффолдов на дефектах ткани (хитозан-силоксановые сферы с инкорпорированным $SeCl_3$) [7], а также они перспективны как биологически активные вещества, которые влияют на свободно радикальные

процессы окисления в тканях и антиоксидантную активность [8].

Настоящие и будущие области применения соединений с RE требуют изучения этих соединений в формах, имеющих отношение к области использования, нахождения корреляционных связей и установления или предложения роли ионов RE в проявлении их функциональных свойств. Научный и практический интерес представляет исследование молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов с ионами RE , фармакологическая активность которых определяется не только их составом и строением, но и состоянием функциональных групп в препарате [9].

Цель настоящего исследования – изучить антимикробную активность солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ ($RE = La, Ce, Gd, Yb, Y$) как в индивидуальном виде, так и в составе композиционных гидрогелей с поли-N-винилпирролидоном, в отношении широкого круга микроорганизмов и предложить возможные причины реализации свойств.

Данная работа является продолжением цикла работ по исследованию бактерицидных и бактериостатических свойств композитов разной природы (цеолиты, полимеры, гидрогели) с нанораз-

мерными оксидами цинка и оксидами титана (IV) [10–15], а также композиционных гидрогелей на основе поли-N-винилпирролидона (ПВП, $(C_6H_9NO)_n$) с поликристаллическими солями $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$: с $RE = La, Gd, Yb$ [16] и Ce, Y [17]. Причем антимикробная активность солей и композитов с ПВП изучена и представлена только в отношении ограниченного круга микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*), а образцы исследованы методами рентгенографии, малоуглового рентгеновского рассеяния и электронной микроскопии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования. Гидрогели на основе ПВП получены золь-гель технологией из ПВП, сшивающего агента тетраэтоксисилана (ТЭОС, $Si_4H_{10}O_4$) и порошков $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = La, Ce, Gd, Yb$ и Y . Для этого к 11% водному раствору ПВП добавляли молочную кислоту (катализатор) и ТЭОС с концентрациями 0.01 и 5.04 мас. % соответственно. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и выливали в форму с крышкой. Толщина вылитых смесей составляла 4–6 мм. При получении композиционных гидрогелей ПВП/ $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (в дальнейшем будем обозначать их как ПВП/RE) порошки солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (далее обозначены как RE) добавляли в количестве 5.59 мас. % до введения ТЭОС. Условия получения гидрогелей ПВП и ПВП/RE одинаковы.

Рентгенографическое изучение солей. Исследования солей RE методом порошковой рентгеновской дифракции проводились на экспериментальной станции Рентгеноструктурного анализа (РСА) Курчатовского источника синхротронного излучения [18] с использованием монохроматического излучения с длиной волны $\lambda = 0.8 \text{ \AA}$ (энергия фотонов $E = 15498 \text{ эВ}$), фокусированного на образце размером до 400 мкм. Измерения проводились в геометрии Дебая–Шеррера (на просвет), образец помещался в криопетлю размером 300 мкм и в процессе измерения вращался вокруг горизонтальной оси для усреднения дифрактограмм по ориентациям образца. Регистрация дифракционных картин осуществлялась двумерным позиционно-чувствительным детектором Rayonix SX165, располагавшимся на расстоянии 150 мм от образца под углом $2\theta = 29.5^\circ$ к оси прямого пучка. Время экспозиции составляло 5 мин. Полученные двумерные дифрактограммы интегрировались к одномерному виду (к зависимости $I(2\theta)$) с использованием программы Dionis [19]. Калибровка угловой шкалы детектора и определение аппаратного уширения дифракционных рефлексов осуществлялись за счет измерения поликристаллического стандарта LaB_6 (NIST SRM

660a). Определение параметров микроструктуры и размеров элементарной ячейки RE проводилось в программе Jana2006 [20].

Дифференциально-сканирующая калориметрия образцов. Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК) порошков RE и нативных гидрогелей ПВП/RE проведена на приборе Netzsch DSC 204 (Phoenix, Германия). Навески порошков или гидрогелей помещали в стандартный алюминиевый тигель с проколотой крышкой. Сканирование осуществляли со скоростью 10 град/мин в атмосфере аргона (99.99%) при скорости потока 100 мл/мин в интервале температур от 25 до 600°C. Результаты обрабатывали с помощью программы Netzsch Proteus. Точность определения температуры 0.1°C.

Рентгеновские исследования на поверхности растворов солей. Для проведения экспериментов на поверхности растворов соли $Yb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ формировали фосфолипидные монослои. Для этого использовали 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфолипид (ДПФГ) и 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДПФЭ) (Sigma). Растворы фосфолипидов (смесь хлороформ/метанол в соотношении 9:1 с концентрацией 0.45 мг/мл) наносили на поверхность раствора соли $Yb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с концентрацией 10^{-4} M , pH 6.5. Монослой поджимали до давления $\pi = 25 \text{ мН/м}$, которое во время рентгеновских измерений поддерживалось постоянным. Контрольные измерения проводили на монослоях ДПФГ и ДПФЭ, сформированных на чистой воде. Все растворы были приготовлены с использованием воды высокой степени очистки (сопротивление $>18 \text{ МОм} \cdot \text{см}$), полученной на установке Millipore Corp. Измерения проводили при комнатной температуре.

В эксперименте использован метод стоячих рентгеновских волн (СРВ) в геометрии полного внешнего отражения (ПВО) [21]. В рамках этого метода наряду с рентгеновским отражением регистрировался выход вторичных излучений, возникающих при неупругом рассеянии рентгеновских лучей в условиях ПВО. Такие измерения позволяют получать информацию о положении атомов определенного сорта вдоль нормали к поверхности из анализа угловых зависимостей интенсивности выхода вторичного излучения. Изменения кристаллической структуры фосфолипидных монослоев фиксировали с помощью метода дифракции рентгеновских лучей в геометрии скользящих углов падения.

Измерения проводили на Курчатовском источнике синхротронного излучения на экспериментальной станции “Ленгмюр”. Во всех экспериментах использовали излучение с энергией 13 кэВ. Спектры флуоресцентного излучения регистрировали кремниевым дрейфовым детекто-

ром Vortex EX-90 (SII-Hitachi), расположенным перпендикулярно к поверхности водной субфазы на расстоянии ~ 10 мм. Двумерные карты дифракционного рассеяния на фосфолипидных монослоях записывали при использовании линейного позиционно-чувствительного детектора Mythen-1k (Dectris), установленного в вертикальном положении и обеспечивающего параллельное измерение q_z -сечений в диапазоне от 0 до 0.8 \AA^{-1} . Измерение интенсивности в горизонтальной плоскости рассеяния (q_{xy} -направление) осуществляли угловым сканированием детектором с коллиматором Соллера с угловой апертурой 2 мрад. Для уменьшения рассеяния излучения на воздухе и снижения испарения жидкости измерения (общее время составляло 24 ч) проводили в атмосфере увлажненного гелия.

Антимикробная активность (в темноте). Микробиологические исследования по изучению антимикробной активности (АМА) поликристаллических солей RE, гидрогелей ПВП и ПВП/RE проведены методом “колодцев” в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* [22]. Взвесь определенного вида микроорганизмов, содержащую 10^7 – 10^8 КОЕ в 1 мл, засеивали “газоном” в чашки Петри на агар Мюллера–Хинтона в количестве 0.2 мл. На поверхности агара, засеянного культурами микроорганизмов, делали лунки с помощью тонкостенного цилиндра диаметром 6–8 мм, в которые помещали образцы. Для исследования солей RE их насыпали ровным слоем, а для изучения гидрогелей были вырезаны нативные образцы в виде круга диаметром 13 мм и толщиной 4–6 мм. Далее чашки с испытуемыми образцами помещали в термостат при 37°C на 24 ч. Результаты оценивали по размеру (диаметру) зоны задержки роста микроорганизмов вокруг лунки (величина Д, мм) с помощью линейки, включая диаметр самой лунки.

Степень чувствительности микроорганизмов к исследуемым образцам зависит от величины Д: чем она больше, тем выше чувствительность. По величине зоны задержки роста образцы делятся на четыре группы: $D < 10$ мм – отсутствие чувствительности, $D = 11$ – 15 мм – малая чувствительность, $D = 15$ – 25 мм – средняя чувствительность, $D > 25$ мм – высокая чувствительность к микроорганизмам [23]. Микробиологические исследования проведены в боксе микробиологической защиты второго класса, оснащенный УФ-лампой и ламинарным потоком воздуха.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

RE(NO₃)₃ · xH₂O (соли). Образцы RE демонстрируют высокую АМА в отношении *Staphylo-*

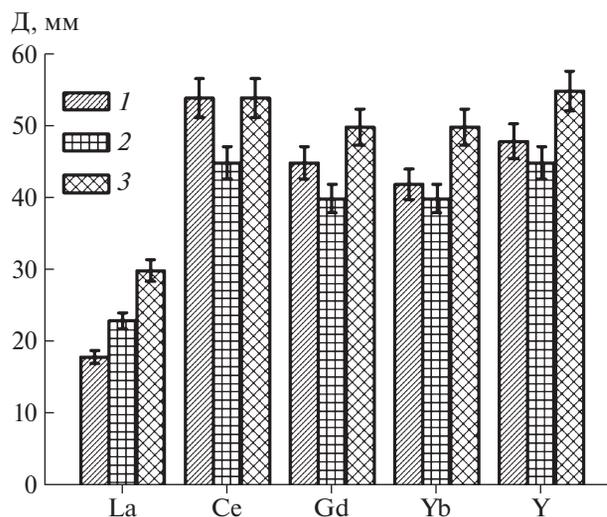


Рис. 1. Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов (в темноте) в присутствии солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ ($RE = La, Ce, Gd, Yb$ и Y): *Staphylococcus aureus* (1), *Escherichia coli* (2), *Candida albicans* (3).

coccus aureus, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (самая высокая), наибольшая из них у $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = Y$ и Ce (рис. 1).

Наблюдается несколько бóльшая активность RE к грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*, за исключением соли $La(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (La), у которой высокая АМА только в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, а к остальным микроорганизмам эта соль в твердом виде проявляет среднюю чувствительность (рис. 1). Величина Д для *Escherichia coli* и *Candida albicans* убывает в ряду образцов $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $Y > Ce > Gd \approx Yb > La$, а для *Staphylococcus aureus* в другом ряду $Ce > Y > Gd > Yb > La$ (рис. 1). Согласно [24] антимикробная активность по отношению к грибам *Rhizopus nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Neurospora sitophila*, *Coprinus sp.* снижается в ряду $Lu > Y > Er > Ho > Dy > Eu > Nd > Ce$, что согласуется с нашими данными для другого вида грибов *Candida albicans*.

Причину разного поведения АМА солей RE нужно искать как в характеристиках самих образцов, так и в природе и строении микроорганизмов.

Анализ дифракционных картин RE (рис. 2) и результаты расчета структурных параметров (табл. 1) свидетельствуют о том, что поликристаллические соли по типу структуры разделяются на три группы: с $RE = La$ и Ce (первая группа), $RE = Gd$ и Y (вторая), $RE = Yb$ (третья), причем образец $Yb(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ не однофазный.

Объемы элементарной ячейки образцов уменьшаются в ряду RE: $Gd > Y > La > Ce > Yb$, что не коррелирует с размерами ионов ($r_{La} > r_{Ce} > r_{Gd} > r_Y > r_{Yb}$; r – радиус иона) и не имеет связи с

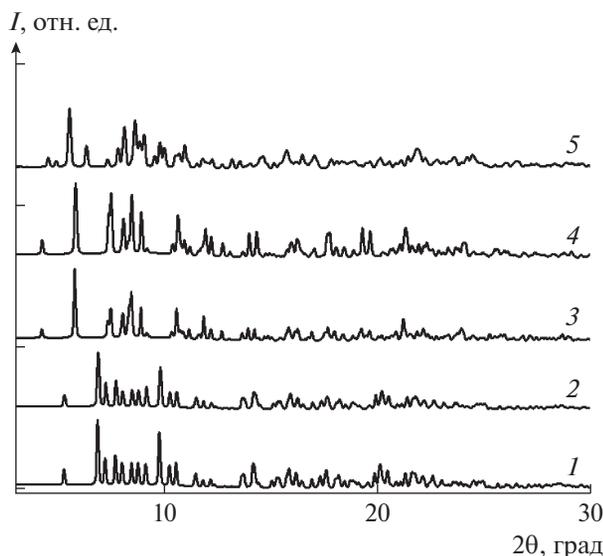


Рис. 2. Дифрактограммы солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, где $RE = La$ (1), Ce (2), Gd (3), Y (4) и Yb (5).

АМА. Предполагаемая в литературных источниках связь АМА с порядковым номером (атомным весом) RE [25] отсутствует. Не наблюдается и связь АМА с химической активностью RE , которая по данным [26] снижается от La до Lu , что обусловлено уменьшением радиусов RE .

Образцы RE отличаются средними размерами кристаллитов (D , нм), которые убывают в ряду $Gd > Y > La > Ce > Yb$, и величинами микронапряжений (ϵ , %): $Yb > Y > Ce > La > Gd$ (табл. 1). Можно сделать вывод (в первом приближении), что АМА поликристаллических солей RE связана с микронапряжениями, если исключить неоднородный образец Yb , для которого большая величина ϵ вызывается напряжениями на границе фаз.

Судя по общему виду составов кристаллогидратов $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, они могут содержать и одинаковое, и разное количество молекул воды (величина x). На дифрактограммах образцов наблюдается перераспределение интенсивностей отдельных пиков, причем в меньшей степени для образцов первой группы структур (La , Ce) и в большей степени для образцов второй группы (Gd , Y) (рис. 2). Такой характер отличий интенсивностей отражений в рамках изоструктурных (предположительно) исследуемых фаз в рамках одной группы может быть обусловлен не только видом RE , но и разным содержанием молекул кристаллизационной воды. Это вывод подтверждается результатами ДСК (рис. 3, табл. 2): количество кристаллизационной воды убывает в ряду $REY > Ce > Gd > Yb > La$ (овалами на рис. 3 отмечены полосы, связанные со стадиями удаления воды из кристаллогидратов).

Процесс термического разложения $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ довольно сложный, многостадийный, с разными этапами и температурами в зависимости от RE [27–35]. В табл. 2 этот процесс представлен в виде обобщения.

Можно отметить лишь общие черты пиролиза $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$: при низких температурах удаление воды и кислородно-азотных соединений из исходных солей и промежуточных оксонитратов разного состава, а при повышении температуры дальнейшая дегидратация с потерей оксидов азота, воды и кислорода с образованием оксидов RE . Так, при разложении $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ при 130 и 150°C образуются соответственно $La(NO_3)_3 \cdot 4H_2O$ и $La(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ [34], выше 250°C найден $La(NO_3)_3$ [36], разложение которого начинается при ~375–400°C [35, 36]. Пик с максимумом при 412°C относят к разложению $La(NO_3)_3$, а плечо

Таблица 1. Результаты рентгенографического изучения образцов $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$

Характеристики $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$	RE				
	La	Ce	Gd	Y	Yb
Пр. гр.	$P\bar{1}$				
a , Å	8.92730(15)	8.9061(2)	6.7410(2)	6.72302(17)	6.6100(6)
b , Å	10.71215(17)	10.6905(3)	9.1338(2)	9.0697(2)	9.6483(11)
c , Å	6.65303(13)	6.6259(2)	11.6453(3)	11.5779(3)	10.5472(10)
α , град	78.8714(13)	78.811(2)	70.0476(18)	70.4703(15)	63.401(7)
β , град	77.9173(13)	77.808(2)	88.8375(19)	88.8505(17)	84.735(6)
γ , град	87.8848(13)	87.891(2)	69.2312(17)	69.0980(13)	75.947(7)
V , Å ³	610.436(19)	604.90(3)	626.03(3)	617.61(3)	583.35(11)
Средний размер кристаллитов по Шерреру, D , нм	164.4	117.7	205.3	202.2	77.5
Величина микронапряжений, ϵ , %	0.164	0.227	0.146	0.245	1.166

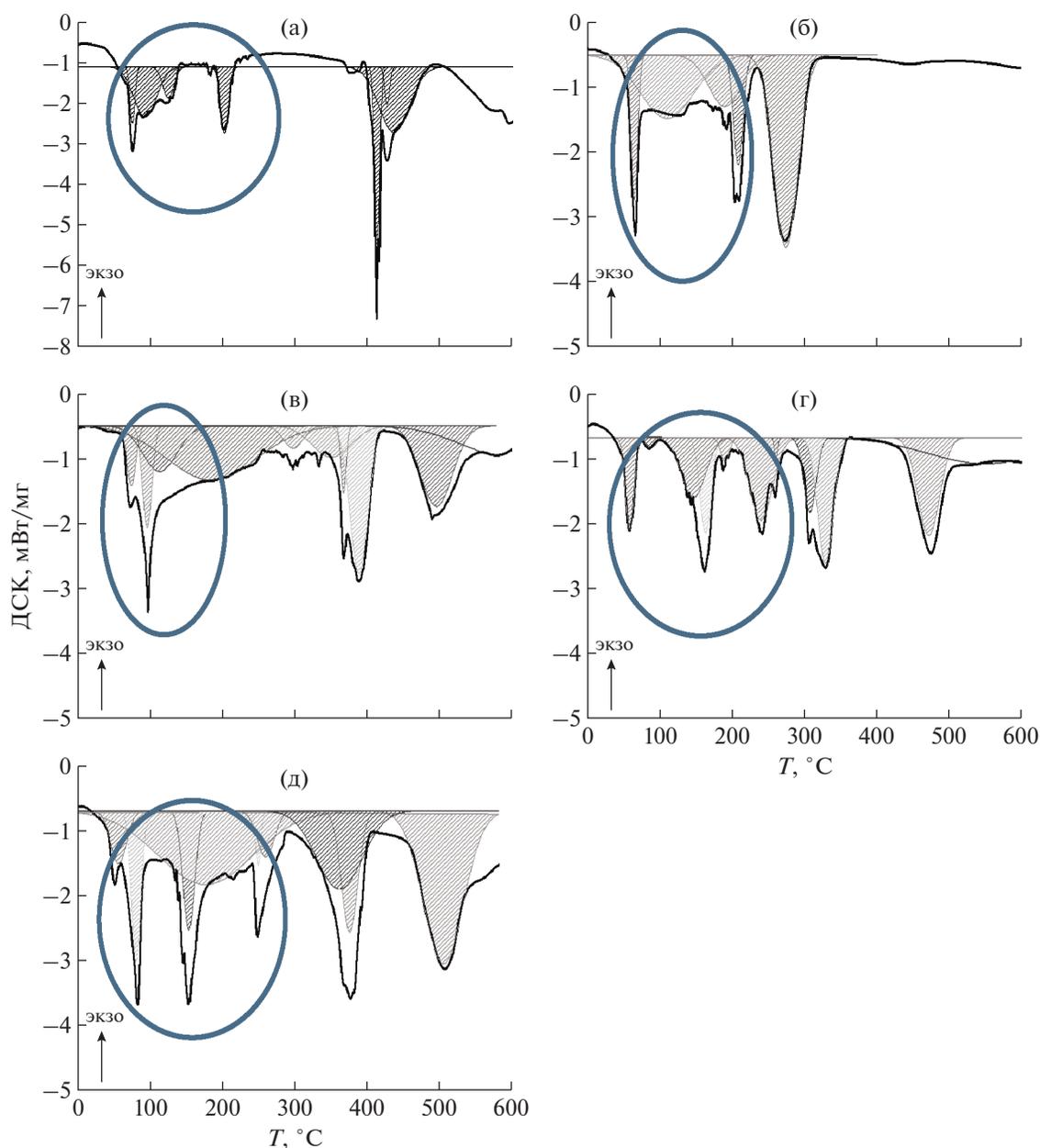


Рис. 3. ДСК-термограммы для поликристаллических солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = La$ (а), Ce (б), Gd (в), Yb (г), Y (д).

при $\sim 426^\circ C$ – к разложению оксинитрата $LaONO_3$ (табл. 2).

С уменьшением содержания воды в солях RE уменьшается их АМА, причем такая связь количества молекул воды в образцах с АМА установлена в [37, 38].

Таким образом, содержание кристаллизационной воды в солях $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ и величина микронапряжений образцов симбатно коррелируют с АМА в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli*, грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* и грибов *Candida albicans*.

Величина АМА разная в зависимости от RE и вида микроорганизмов, что логично предполагает обращение к строению и составу бактерий, прежде всего их оболочек (мембран), в состав которых входят фосфолипиды, являющиеся защитным слоем клеток. Важнейшая функция мембран – регуляция обмена веществ между клеткой и средой, а также между различными отсеками (компартаментами) внутри самой клетки. Около 20% всей массы мембраны составляет прочно связанная вода, а также катионы, преимущественно Ca^{2+} и Mg^{2+} , входящие в хелатные комплексы.

Таблица 2. Соотнесение максимумов (T , °C) на ДСК-термограммах с возможными термическими процессами солей $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = La, Ce, Gd, Yb$ и Y

La	Ce	Gd	Yb	Y	Термический процесс
77.6	68.8	74.6	59.4	53.2	Начало дегидратации $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ Стадии дегидратации $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$
90.7	78.2	99.1	86.5	84.7	
96.9				154.7	
130.4	125.3	115.9	147.2		
			162.9		
	194.4	185.4		178.4	
202.2	204.9		191.3	217.0	
			242.3	249.5	
	274.4	298.9	260.8	260.8	Стадии денитрификации $RE(NO_3)_3$
			305.9		
			328.8		
		351.2			
		368.0		362.6	
		388.2		377.6	
412.2					
426.7					Разложение $REONO_3$ Образование RE_2O_3
437.2		489.2	473.5	507.2	

Таблица 3. Соотнесение максимумов (T , °C) на ДСК термограммах с возможными термическими процессами гидрогелей ПВП/ $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = La, Ce, Gd, Yb$ и Y

ПВП	ПВП/La	ПВП/Ce	ПВП/Gd	ПВП/Yb	ПВП/Y	Отнесение пиков
9.5	4.8	—	−2.4	3.6	—	Промежуточная, или кластерная вода Свободная вода в сетке гидрогелей и связанная вода
109.0	93.2	99.1	84.9	100.2	101.2	
—	—	—	167.9	157.2	—	Стадии разложения $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$
—	274.8	—	261.6	246.7	—	
—	355.8	327.2	347.6	341.5	355.0	Возможно, процессы гидратации или взаимодействия

Антимикробную активность соединений на основе RE определяет образование различных координационных соединений, в том числе с полимерами — белками, и проникновение их в клетки микроорганизмов [1, 2]. Не исключено, что при воздействии солей на микроорганизмы происходит замещение ионов RE^{3+} на ионы Ca^{2+} из-за близости их размеров, что вызывает гибель бактерий [39, 40]. Но это не объясняет найденный ряд АМА для RE . С другой стороны, может произойти нарушение водного баланса клетки при взаимодействии с кристаллогидратами $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, что также нарушит функционирование клетки. Это косвенно подтверждает связь АМА с содержанием воды в солях.

Из-за своей более мощной и непроницаемой клеточной стенки грамотрицательные бактерии (в частности, *Escherichia coli*) более устойчивы к антибиотикам, чем грамположительные, и их патогенность связывают с определенными компонентами их клеточных стенок, а именно с липополисахаридным слоем.

$RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (растворы солей). Антимикробная активность солей с ионами RE в значительной степени зависит от их способности диссоциировать в жидких средах. Характер взаимодействия ионов RE с внешней мембраной бактериальной клетки играет определяющую роль в развитии целого каскада сложнейших биохимических процессов, таких как блокировка

ионных каналов или активных транспортных систем клеточной оболочки бактерии, образование комплексов с белками внешней мембраны с последующим изменением структурно-функционального состояния белковых молекул. Не исключено также прооксидантное действие ионов *RE* на мембранные липиды.

Изучать молекулярные механизмы взаимодействия ионов *RE* с клеточной оболочкой бактерий можно с помощью экспериментов на модельных системах, в первую очередь на упорядоченных липидных монослоях, которые по своему составу и морфологии представляют собой адекватную модель биологических мембран. В проведенных исследованиях использованы фосфолипиды фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин, которые относятся к основным липидам наружной бактериальной мембраны. Фосфатидилэтаноламин составляет 60–80% фосфолипидов в грам-отрицательных бактериях (например, *Escherichia coli*), фосфатидилглицерин наиболее часто встречается в грамположительных бактериях (например, *Staphylococcus aureus*) [41, 42]. Исследования были посвящены выявлению механизмов взаимодействия соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, обладающей высокой АМА (рис. 1), с фосфолипидным монослоем.

Для изучения влияния раствора $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ на молекулярную упаковку монослоев ДПФГ и ДПФЭ были выполнены измерения с помощью метода дифракции в геометрии скольжения углов падения (данные не представлены). На протяжении всего времени измерений (24 ч) изменений на картах дифракционного рассеяния не наблюдалось. Кроме того, в обоих случаях не было выявлено каких-либо отличий от контрольных данных, полученных при измерениях для монослоев на чистой воде. Эти результаты позволяют сделать заключение, что присутствие соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ в водной субфазе (в концентрации, использованной в проведенных экспериментах) не вызывает каких-либо повреждений кристаллической структуры монослоев ДПФГ и ДПФЭ.

Результаты исследований с помощью метода СРВ на монослоях ДПФГ и ДПФЭ, а также на растворе соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ приведены на рис. 4 и 5. Кривая выхода Yb -флуоресценции, записанная при измерениях на растворе соли (без нанесения фосфолипидного монослоя), имеет характерный вид: при углах, меньших критического угла ПВО, интенсивность флуоресценции близка к нулю, вне области ПВО при $\theta > \theta_c$ интенсивность резко увеличивается. Такой ход угловой зависимости обусловлен изменением глубины проникновения волнового поля: в пределах области ПВО рентгеновское излучение практически не проходит в водную субфазу. Для $\theta > \theta_c$ глубина проник-

Интенсивность Yb -флуоресценции, отн. ед.

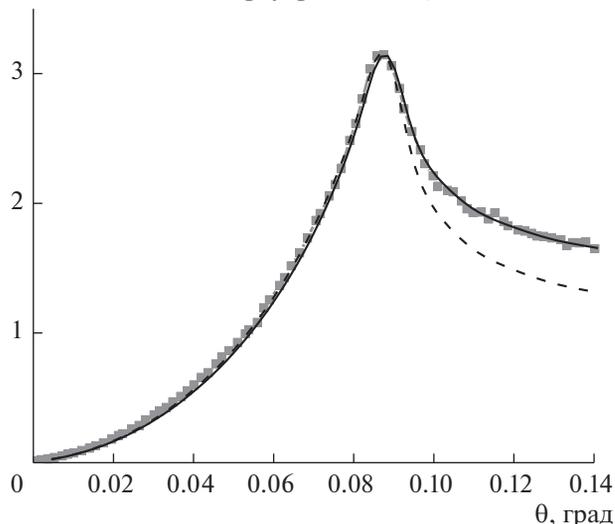


Рис. 4. Экспериментальная угловая зависимость выхода Yb -флуоресценции от монослоя ДПФГ, сформированного на поверхности раствора соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Сплошная линия — расчет, наилучшее совпадение. Пунктирная линия — расчет для ситуации, когда атомы-источники флуоресценции присутствуют в слое толщиной 10 Å, расположенном на расстоянии 25 Å от границы раздела воздух/пленка.

новения поля увеличивается от нескольких нанометров до нескольких сотен микрон. В результате значительно увеличивается число атомов, испускающих флуоресцентные кванты, и интенсивность выхода флуоресценции возрастает на несколько порядков.

Принципиально иной ход угловой зависимости Yb -флуоресценции зарегистрирован в исследованиях на монослое ДПФГ (рис. 4). В этих измерениях интенсивность выхода флуоресценции монотонно растет с увеличением угла — от нуля при $\theta = 0$ мрад до максимального значения в окрестности критического угла ПВО. Физический смысл таких модуляций на угловой зависимости становится ясен из рассмотрения особенностей стоячей рентгеновской волны, формирующейся в условиях ПВО: при малых углах у поверхности отражающего зеркала (водной субфазы) находится минимум интенсивности волнового поля, а вблизи критического угла ПВО — максимум интенсивности. Экспериментальные данные, полученные в измерениях на монослое ДПФГ, однозначно указывают на концентрирование ионов иттербия из объема водной субфазы к поверхности. Угловая зависимость выхода Yb -флуоресценции, записанная в исследованиях на монослое ДПФЭ, по форме ближе к кривой выхода Yb -флуоресценции от раствора соли (рис. 5). Лишь незначительное увеличение интенсивности Yb -флуоресценции вблизи критического угла

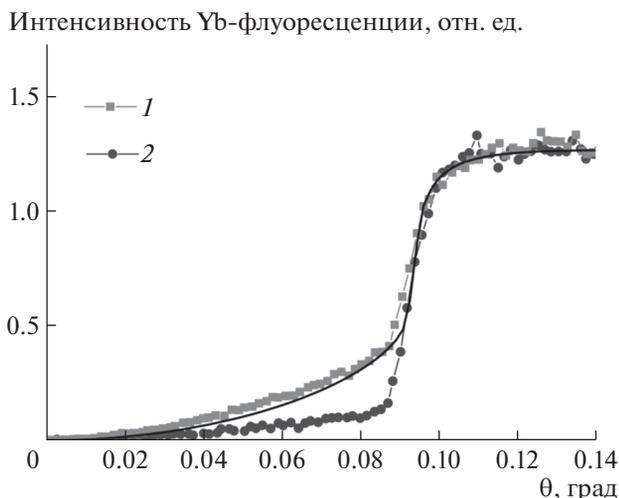


Рис. 5. Экспериментальная угловая зависимость выхода Yb-флуоресценции от монослоя ДПФЭ, сформированного на поверхности раствора соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (кривая 1). Для сравнения приведена экспериментальная угловая зависимость выхода Yb-флуоресценции от раствора соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (кривая 2). Сплошная линия – расчет, наилучшее совпадение.

свидетельствует о концентрировании небольшого количества ионов иттербия у поверхности.

Оценки параметров распределения ионов иттербия под монослоями ДПФГ и ДПФЭ получены на основе математического моделирования экспериментальных угловых зависимостей выхода Yb-флуоресценции. Оказалось, что в обоих случаях угловые зависимости выхода Yb-флуоресценции представляют собой сумму вкладов от ионов иттербия, адсорбированных в тонком слое у нижней границы фосфолипидного монослоя, и

ионов иттербия, присутствующих в растворе соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ в объеме водной субфазы. Толщина тонкого слоя составляет $D_L = 10 \pm 5 \text{ \AA}$, слой находится на расстоянии $25 \pm 5 \text{ \AA}$ от границы воздух/пленка. Суммируя кривые выхода флуоресценции от этого слоя и от водной субфазы с соответствующими весовыми множителями K_L и K_S , можно добиться совпадения расчетных кривых и экспериментальных данных. При этом отношение весовых множителей K_L/K_S дает представление о соотношении концентрации иттербия в тонком слое и в объеме водной субфазы. Наилучшее совпадение между расчетом и экспериментальными данными было получено для следующих значений отношения K_L/K_S : 2.5 для монослоя ДПФГ и 0.1 для монослоя ДПФЭ. Иными словами, концентрация ионов иттербия, адсорбированного в тонком слое под монослоем ДПФГ, оказалась в 25 раз выше, чем под монослоем ДПФЭ. Такое различие легко объяснить, если учесть, что в монослое ДПФГ головки фосфолипидных молекул имеют отрицательный заряд, тогда как у молекул ДПФЭ головка в целом электронейтральна.

Таким образом, можно утверждать, что при использованной в проведенных экспериментах концентрации соли $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ нарушений кристаллической структуры фосфолипидных монослоев не наблюдается; об этом свидетельствует отсутствие изменений на двумерных картах дифракционного рассеяния. Однако благодаря электростатическому взаимодействию часть ионов иттербия концентрируется под фосфолипидным монослоем. Причем наиболее интенсивно такие процессы происходят в случае фосфолипида ДПФГ с отрицательно заряженной головной группой.

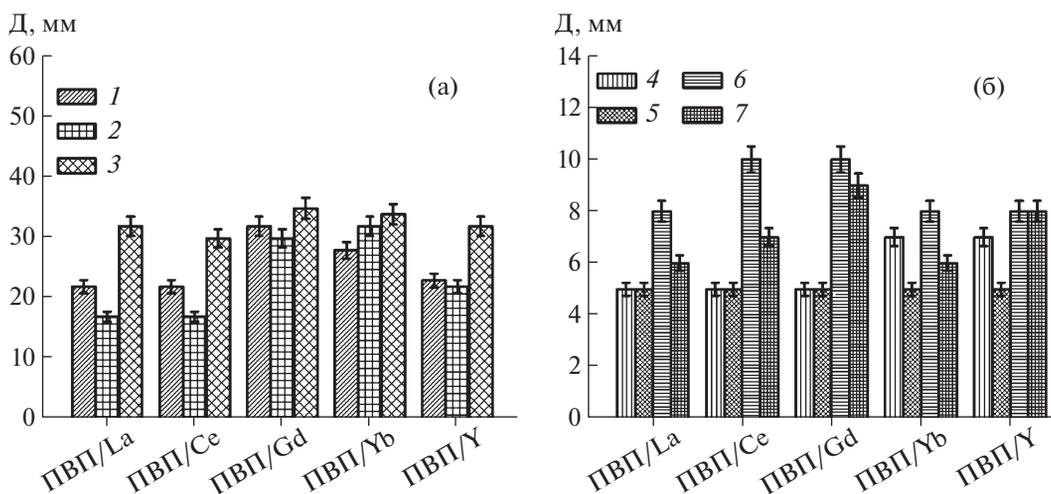


Рис. 6. Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов (в темноте) в присутствии композиционных гидрогелей ПВП/ $\text{RE}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ с $\text{RE} = \text{La}, \text{Ce}, \text{Gd}, \text{Yb}$ и Y : *Staphylococcus aureus* (1), *Escherichia coli* (2), *Candida albicans* (3) (a) и *Staphylococcus epidermidis* (4), *Pseudomonas aeruginosa* (5), *Proteus mirabilis* (6), *Klebsiella pneumoniae* (7) (б).

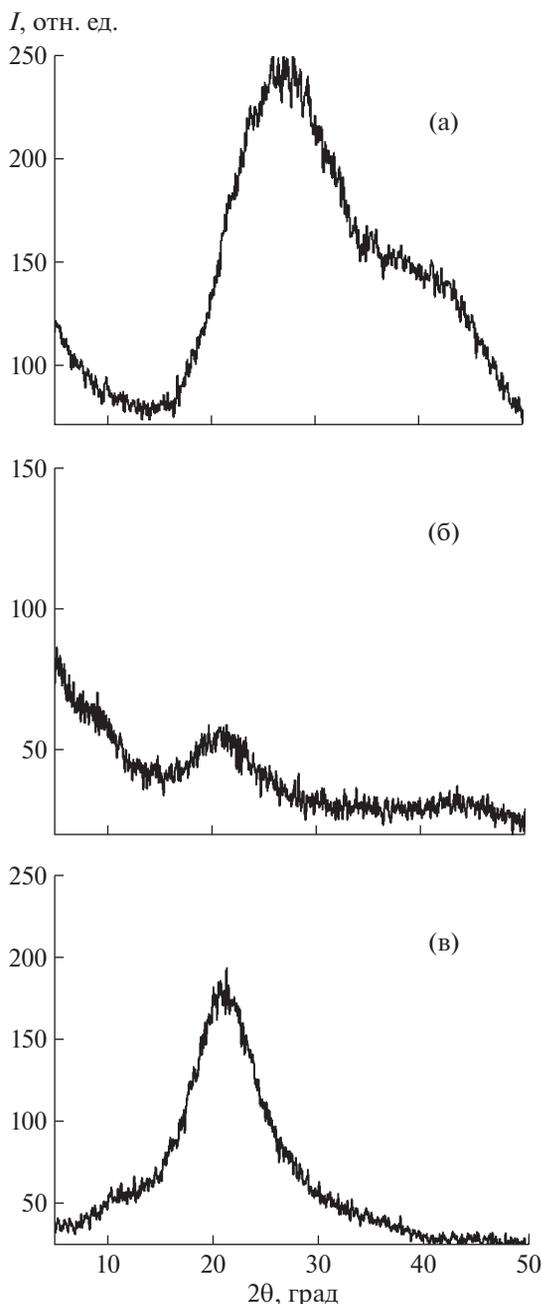


Рис. 7. Дифрактограмма нативных гидрогелей ПВП (а), ПВП/Gd (б) и ПВП/Ce (в).

Композиты в системе ПВП– $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$. Для разработки антимикробных препаратов с участием $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ необходимо создание формирующей основы. Такой основой представляется гидрогель на основе водорастворимого, биосовместимого и нетоксичного полимера поли-N-виллилпирролидонона – ПВП ($(C_6H_9NO)_n$). При этом ПВП не обладает антимикробными свойствами.

Композиционные гидрогели ПВП/RE с RE = Gd, Yb проявляют бактерицидные свойства с

высокой чувствительностью к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, с RE = La, Ce, Y – со средней чувствительностью к *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, с RE = La – с малой чувствительностью к *Escherichia coli* (рис. 6а).

АМА уменьшается в рядах ПВП/Gd > ПВП/Yb > ПВП/La ≈ ПВП/Y > ПВП/Ce для *Candida albicans*, ПВП/Gd > ПВП/Yb > ПВП/Y > ПВП/La ≈ ПВП/Ce для *Staphylococcus aureus*, ПВП/Yb > ПВП/Gd > ПВП/Y > ПВП/La ≈ ПВП/Ce для *Escherichia coli* (рис. 6а).

Присутствие частиц с лантаном в гидрогеле ПВП/La увеличивает активность только по отношению к *Staphylococcus aureus* по сравнению с исходным порошком $La(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (рис. 1). Во всех остальных случаях антимикробные свойства ПВП/RE меньше, чем у $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$. Причем АМА остается наименьшей у образцов с La, а на первый план выходят ПВП/RE с Gd и Yb (рис. 6а) по сравнению с исходными солями с RE = Y и Ce с наибольшей АМА (рис. 1). Самая высокая АМА исходных порошков $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ (RE = La, Gd, Yb) и гидрогелей с их участием проявляется по отношению к грибам *Candida albicans* (диаметр зоны задержки роста >30 мм). Необходимо учитывать тот факт, что при синтезе гидрогелей присутствующие в них ионы RE могут образовывать комплексы с молекулами воды, полимера, ТЭОС, которые составят конкуренцию за координацию RE с патогенными микроорганизмами. Все это приводит к снижению АМА композиционных гидрогелей ПВП/RE по сравнению с солями RE.

Общий вид дифракционных картин нативных гидрогелей ПВП и ПВП/RE с двумя диффузными пиками практически одинаковый (рис. 7).

Первый, наиболее интенсивный, пик (межплоскостное расстояние $d_1 \sim 4 \text{ \AA}$) на дифрактограммах ПВП и ПВП/RE (рис. 7) отвечает за меж- и внутримолекулярные расстояния между центрами масс кольца с гидрофильными группами – N–C=O и сильным внутрицепочечным вкладом. К этой боковой группе водородными связями присоединяется связанная вода: –N–C=O...H–O...H: чем меньше межплоскостное расстояние d_1 и больше интенсивность пика, тем больше молекул связанной воды. Из двух образцов ПВП/RE, представленных на рис. 7, наибольшее содержание связанной воды в ПВП/Gd (рис. 7в).

Второй малоинтенсивный диффузный пик ($d \sim 2 \text{ \AA}$) обусловлен промежуточной или кластерной водой, физически захваченной между гидратированными полимерными цепями и связанной с цепями полимера гидрофобными взаимодействиями [16]. Этой воды больше в ПВП/Ce (рис. 7б).

Третий маловыраженный диффузный пик ($d \sim 9 \text{ \AA}$), отсутствующий на дифрактограмме ПВП

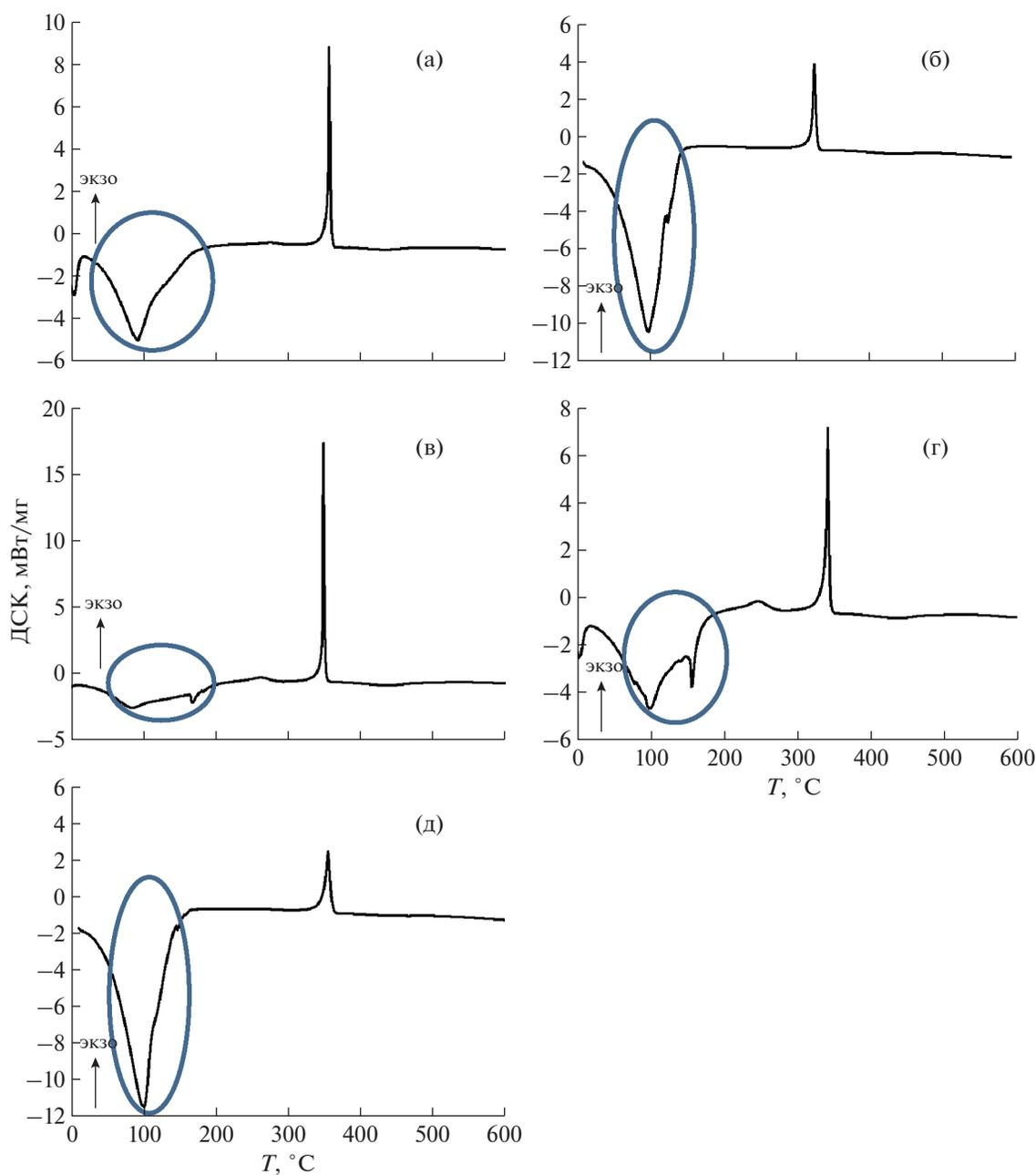


Рис. 8. ДСК-термограммы нативных гидрогелей ПВП/ $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ с $RE = La$ (а), Ce (б), Gd (в), Yb (г) и Y (д).

(рис. 7а), относится к межмолекулярным расстояниям между основными полимерными цепочками $-CH_2-CH_2-$ и отвечает за свободную воду, которая находится в сетке гидрогелей. Содержание этой воды явно больше в ПВП, так как пик, отвечающий за этот вид воды, выходит за пределы дифрактограммы.

На дифрактограммах отсутствуют дифракционные пики, относящиеся к $RE(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, что свидетельствует о наличии в гидрогелях ионов RE и/или кластеров разного состава с ионами RE .

По данным ДСК (рис. 8, табл. 2) содержание всех видов воды уменьшается в ряду ПВП/ $Y > > PVPP/Ce(La) > PVPP/Yb > PVPP/Gd$ (что согласуется с рентгенографическими данными [16]), т.е. содержание воды в композиционных гидрогелях антибатно коррелирует с АМА.

Не исключено, что присутствие воды в композиционных гидрогелях “разбавляет” концентрацию функциональных ионов RE^{3+} в составе ПВП/ RE , так как известно, что увеличение концентрации функциональных групп увеличивает антимикробную активность [10, 37, 43]. Однако

не следует забывать о присутствии в растворе солей кислоты HNO_3 [32], которая также может влиять на бактерицидные свойства.

Композиционные гидрогели ПВП/РЕ проявляют не бактерицидные, а бактериостатические свойства к грамположительным бактериям *Staphylococcus epidermidis* и грамотрицательным *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* (рис. 4б), что приводит не к гибели микроорганизмов, а лишь к прекращению их роста и размножения. Проявление действия гидрогелей разное в зависимости от природы бактерий и вида РЕ: *Proteus mirabilis* – ПВП/Се \approx ПВП/Гд $>$ $>$ ПВП/Ла \approx ПВП/Уб \approx ПВП/У, *Klebsiella pneumonia* – ПВП/Гд $>$ ПВП/У, ПВП/Се $>$ ПВП/Ла \approx \approx ПВП/Уб, *Staphylococcus epidermidis* – ПВП/Уб \approx \approx ПВП/У $>$ ПВП/Ла \approx ПВП/Се \approx ПВП/Гд.

Анализ результатов, представленных на рис. 6, показывает явную связь бактерицидных (бактериостатических) свойств композитов ПВП/РЕ с составом и строением бактерий (но не с группой бактерий: грамположительные или грамотрицательные), которые по-разному взаимодействуют с ионами редкоземельных металлов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты по изучению антимикробной активности в темноте солей $\text{RE}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (РЕ) и тех же солей в составе композиционных гидрогелей с ПВП (ПВП/РЕ) в отношении широкого круга микроорганизмов свидетельствуют о многофакторной связи бактерицидных и бактериостатических свойств как с характеристиками солей и гидрогелей, так и с природой микроорганизмов. Тем не менее проведенные исследования позволяют выделить соли $\text{RE}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ с РЕ = Се, Гд, Уб, У, которые обладают ярко выраженными бактерицидными свойствами с высокой чувствительностью (зона задержки роста >40 мм) к микроорганизмам *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Они могут быть использованы при создании раневых повязок местного применения с антимикробным пролонгированным действием.

Композиционные гидрогели в системе ПВП– $\text{RE}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ проявляют бактерицидные свойства с высокой (РЕ = Гд, Уб) или средней (зона задержки роста >15 мм) чувствительностью к *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, или бактериостатические свойства по отношению к *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*. С другой стороны, высушенные на воздухе гидрогели ПВП и ПВП/РЕ имеют высокую степень набухания в воде: ПВП $>$ ПВП/Се $>$ ПВП/Ла $>$ $>$ ПВП/У $>$ ПВП/Уб $>$ ПВП/Гд (часть из них представлена в [16]). Именно совокупность этих

двух важных функциональных свойств ПВП/РЕ отвечает требованиям, предъявляемым к раневым покрытиям медицинского назначения для лечения различных видов ран, трофических язв, а также ожогов.

Выявленные корреляционные связи характеристик $\text{RE}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (РЕ), ПВП и ПВП/РЕ с антимикробными свойствами, представленные как в данной работе, так и в [16, 17], важны для создания новых антимикробных препаратов как в отдельности, так и в сочетании с антибиотиками (для исключения антибиотикорезистентности).

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-03-00330) и Министерством науки и высшего образования в части электронно-микроскопических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rogers H.J., Woods V.E., Syngé C. // J. Gen. Microbiol. 1982. V. 128. P. 2389.
2. Qizhuang H., Jing Y., Hui M., Hexing L. // Mater. Lett. 2006. V. 60. P. 317.
3. Федоров А.И., Искандаров М.И., Искандарова С.С. и др. // Ветеринария и кормление. 2014. № 5. С. 8081.
4. Курочкин В.К., Имашева М.А., Шульга В.Я. и др. // Государственный НИИ органической химии и технологии. 1-й съезд токсикологов России. М., 1998.
5. Бондаренко В.З., Искандарова С.С., Федоров А.И. и др. // Труды ВИЭВ. 2013. Т. 77. С. 304.
6. Ignjatovic N.L., Mancic L., Vukovic M. et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1.
7. Shirosaki Y., Nakatsukasa M., Yasutomi S. et al. // Polymers (Basel). 2019. V. 11. № 10. P. 1.
8. Antonenko T.A., Shpakovsky D.B., Gracheva Yu A. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2017. V. 455. № 1. P. 276.
9. Грошева В.И. Автореф. дисс. “Особенности комплексообразования тетрациклина с ионами редкоземельных металлов” канд. физ.-мат. наук. Москва, 2006. 20 с.
10. Серхачева Н.С., Яшина Н.В., Прокопов Н.И. и др. // Российские нанотехнологии. 2016. № 1–2. С. 91.
11. Serkhacheva N.S., Gainanova A.A., Kuzmicheva G.M. et al. // Int. J. Polym. Anal. Charact. 2015. V. 20. № 8. P. 743.
12. Domoroschina E., Kravchenko G., Kuz'micheva G. // J. Cryst. Growth. 2017. V. 468. P. 199.
13. Gainanova A., Kuz'micheva G., Khrarov E. et al. // New J. Chem. 2018. V. 42. P. 13025.
14. Timaeva O.I., Chihacheva I.P., Kuzmicheva G.M. et al. // Appl. Nanosci. 2018. V. 8. P. 1729.
15. Тимаева О.И., Кузьмичева Г.М., Чихачева И.П. и др. // Кристаллография. 2019. Т. 64. № 4. С. 974.
16. Timaeva O.I., Arkharova N.A., Orekhov A.S. et al. // Polymer. 2020. V. 186. P. 122079.

17. Мулаков С.П., Кузьмичёва Г.М., Тимаева О.И. и др. // Сборник докладов конференции “Информатика и технологии. Инновационные технологии в промышленности и информатике”, Москва, Россия, 2019. Т. 2. С. 565.
18. Svetogorov R.D., Dorovatovskii P.V., Lazarenko V.A. // Cryst. Res. Technol. 2020. <https://doi.org/10.1002/crat.201900184>
19. Светогоров Р.Д. “Dionis – Diffraction Open Integration Software”. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018660965.
20. Petricek V., Dusek M., Palatinus L. // Z. Kristallogr. 2014. V. 229. № 5. P. 345.
21. Zheludeva S.I., Novikova N.N., Kononov O.V. et al. // X-Ray Standing Wave Technique: Principles and Applications. N. Y.: World Scientific Publishing, 2013. V. 1. P. 355.
22. Доценко Б.М., Бирюкова С.В., Тамм Т.И. и др. // Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран. М.: МЗ СССР, 1989.
23. Блатун Л.А. // Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б.М. Костюченко. 2015. Т. 2. № 3. С. 36.
24. Talburt D.E., Johnson G.T. // Mycologia. 1967. V. 59. № 3. P. 492.
25. Wakabayashi T., Yamamoto A., Kazaana A. et al. // Biol. Trace Elem. Res. 2016. V. 174. № 2. P. 464.
26. Киселев Ю.М., Добрынина Н.А. Химия координационных соединений. М.: Academia, 2007. 352 с.
27. Melnikov P., Arkhangelsky I.V., Nascimento V.A. et al. // J. Therm. Anal. Calorim. 2020. V. 139. № 6. P. 3493.
28. Haschke J.M. // Inorg. Chem. 1974. V. 13. P. 1812.
29. Melnikov P., Nascimento V.A., Consolo L.Z.Z., Silva A.F. // J. Therm. Anal. Calorim. 2013. V. 111. P. 115.
30. Мельников П.П., Насименто В.А., Занони Л.С. // Журнал физической химии. 2012. Т. 86. № 11. С. 1781.
31. Strydom C.A., Van Vuuren C.P.J. // J. Therm. Anal. 1987. V. 32. P. 157.
32. Melnikov P., Arkhangelsky I.V., Nascimento V.A. et al. // J. Therm. Anal. Calorim. 2014. V. 118. № 3. P. 1537.
33. Patil K.C., Rao C.N.R. // Inorg. Nucl. Chem. Lett. 1966. V. 2. № 11. P. 329.
34. Feng P.F., Yang Q.L., Dang X.M. et al. // Rare Met. 2015. V. 34. № 11. P. 814.
35. Strydom C.A., Van Vuuren C.P.J. // Thermochim. Acta. 1988. V. 124. P. 277.
36. Karppinen M., Kylakoski P., Niinisto L., Rodellas C. // J. Therm. Anal. 1989. V. 35. P. 347.
37. Шульгина Т.А. Дисс. “Изучение антимикробных свойств дисперсных систем на основе наночастиц серебра и меди и обоснование перспектив их использования” канд. биологических наук. Саратов, 2015. 117 с.
38. Голубева О.Ю. Дисс. “Пористые алюмосиликаты со слоистой и каркасной структурой: синтез, свойства и разработка композиционных материалов на их основе для решения задач медицины, экологии и катализа” докт. химических наук. Санкт-Петербург, 2016. 438 с.
39. Hirano S., Suzuki K.T. // Environ. Health Perspect. 1996. V. 104. P. 85.
40. Elna P., Moore G.R. // J. Biol. Inorg. Chem. 2001. V. 6. P. 479.
41. Pozo Navas B., Lohner K., Deutsch G. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1716. P. 40.
42. Epanand R.M., Epanand R.F. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1788. P. 289.
43. Liu G., Ran Z., Wang H. et al. // Front. Chem. China. 2008. V. 3. № 1. P. 70.