

УДК 541.18, 579

Антимикробная композиция на основе высокодисперсного оксида цинка и рибавирина

© 2020 Г.Т. СТАДНИЮК^{1*}, К.И. КИЕНСКАЯ¹, И.А. БЕЛОВА¹, М.В. САРДУШКИН²,
И.А. БУТОРОВА², А.Н. КУСКОВ², О.В. УЛЫБИНА¹, Н.Ю. ГУЗНОВА³

¹ Кафедра коллоидной химии. Факультет естественных наук. ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Москва, 125047

² Кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств. Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов, ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Москва, 125047.

³ Поликлиника «Вирмед», Тула, 300028. Россия.

*e-mail: mazi-tova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 20.03.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

Синтезированы нанодисперсии оксида цинка с клиновидной и стержнеобразной формой частиц. Исследована зависимость антимикробной активности частиц ZnO от их формы и размера. Установлено, что частицы стержнеобразной формы обладают более высокой антимикробной активностью в отношении ряда тест-микроорганизмов. Помимо антивирусной, выявлена антибактериальная активность рибавирина. Обнаружено проявление синергетического эффекта в смешанных системах рибавирин — оксид цинка. Предложен состав антимикробной композиции широкого спектра действия.

Ключевые слова: наночастицы, оксид цинка, рибавирин, антимикробная и антибактериальная активность

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-94-98

Повышение устойчивости микроорганизмов к известным антимикробным препаратам представляет собой актуальную проблему, требующую нестандартного подхода к ее устранению. Создание композиций на основе высокодисперсных частиц в сочетании с фармацевтическими субстанциями может являться одним из вариантов такого решения.

В отличие от хорошо исследованных дисперсий металлических наночастиц серебра и золота, наноконпозиции оксидных систем, например, оксида цинка, в отношении их антимикробной активности изучены недостаточно. Практически отсутствуют данные о проявлении синергетического эффекта в смешанных композициях на основе неорганических оксидов и фармацевтических субстанций в плане их воздействия на микроорганизмы различной природы — бактерии, дрожжи, вирусы и т. д.

Цель настоящей работы заключалась в разработке состава антимикробной композиции широкого спектра действия на основе высокодисперсного оксида цинка и рибавирина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Нанодисперсии частиц ZnO получали из нитрата цинка — частицы клиновидной формы — гидролизом соли, стержнеобразной формы — методом осаждения в присутствии аммиака [1]. Форму и размер наночастиц определяли методом сканирующей электронной микроскопии. Антимикробную активность наночастиц ZnO и субстанции рибавирина с содержанием основного вещества 98–99% (Fluka, США), оценивали диско-диффузионным методом по величине зоны отсутствия роста тест-организмов на твердых питательных средах.

Фазовый состав частиц дисперсной фазы устанавливали с помощью рентгенофазового анализа (расшифровка проводилась с использованием картотеки JCPDS). Концентрацию дисперсной фазы определяли термогравиметрическим анализом с использованием вакуумного шкафа Stegler-vak-24 (Китай).

В качестве тест-культур использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus subs. aureus* FDA 209P, *Escherichia coli*

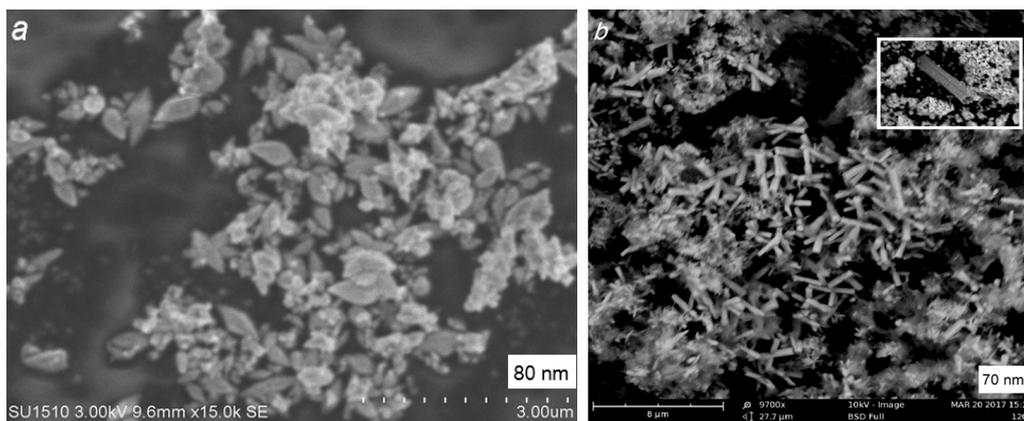


Рис. 1. Микрофотографии частиц ZnO клиновидной формы (a) и высокодисперсных частиц ZnO стержнеобразной формы (b), полученные методом сканирующей электронной микроскопии.

Fig. 1. Micrographs of wedge-shaped ZnO particles (a) and rod-shaped finely dispersed ZnO particles (b) obtained by scanning electron microscopy.

Таблица 1

Основные характеристики синтезированных нанодисперсий ZnO.

The characteristics of the ZnO nanodispersions.

Характеристика	Форма частиц дисперсной фазы	
	Стержнеобразная	Клиновидная
Фазовый состав	ZnO (вюрцит)	ZnO (вюрцит)
Концентрация, % масс.	0,015–0,10	0,030–0,30
Размер частиц d, нм	50–60	60–70

ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 885–653, *Bacillus subtilis* ВКПМ В-13183, *Pseudomonas aeruginosa* ВКПМ В-8243.

Приготовление инокулята тест-культур микроорганизмов проводили путем смыва предварительно выращенных микроорганизмов физиологическим раствором, доводя плотность суспензии стерильным физиологическим раствором до концентрации клеток $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, сравнивая ее с соответствующим стандартом мутности по шкале Мак-Фарланда.

Для определения антимикробной активности подготовленные суспензии тест-организмов в количестве 0,1 мл вносили в чашки Петри на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределяли по поверхности стерильным шпателем Дригальского. Диски готовили из стерильной фильтровальной бумаги диаметром 0,6 см, пропитывали растворами исследуемых нанодисперсий оксида цинка и рибавирина и накладывали на поверхность питательной среды с посеянными тест-культурами. Для обеспечения диффузии активных компонентов образцов в питательную среду чашки Петри оставляли на 1 ч при комнатной температуре, затем помещали в термостат и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. После инкубации в термостате измеряли зоны угнетения роста тест-культур микроорганизмов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 представлены микрофотографии частиц нанодисперсий оксида цинка различной формы. Основные характеристики нанодисперсий представлены в табл. 1.

Рентгенографически было установлено, что, независимо от способа синтеза нанодисперсий, фазовый состав их частиц (как клиновидной, так и стержнеобразной формы) представлен ZnO модификации вюрцит.

Для выявления антимикробного действия были исследованы нанодисперсии оксида цинка с частицами дисперсной фазы различной формы, в качестве образца сравнения была выбрана суспензия грубодисперсного порошка с диаметром частиц 50 мкм. Содержание частиц ZnO во всех исследуемых дисперсиях поддерживалось постоянным и составляло 0,1% масс.

Параллельно проводились исследования по изучению антибактериальной активности водных растворов рибавирина. Выбор именно данной субстанции обусловлен рядом причин. Рибавирин (рис.2a) — (1-бета-D-Рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) относится к модифицированным нуклеозидам и широко известен в качестве противовирусного препарата, применяемого как

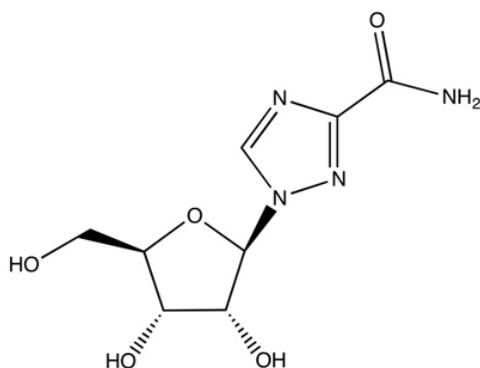


Рис. 2a. Структурная формула рибавирина.

Fig. 2a. The structural formula of ribavirin.

индивидуально, так и в сочетании с интерферонами [2]. Несмотря активное использование в медицине с 50-годов прошлого столетия, механизм действия этого вещества, а также его биологическая активность требуют дальнейшего изучения. На сегодняшний день имеется ряд исследований, подтверждающих некоторую антибактериальную активность рибавирина, однако, такие данные очень немногочисленны и отрывочны [3, 4].

Встречающийся в литературе термин «не антибиотик» вполне можно отнести и к данному соединению. Так, автор публикации [4] вел наблюдение за ингибированием *Salmonella typhi* у мышей. Через 4 ч после введения инфекции (10^6 КОЕ / мышь) перорально был введён рибавирин (100 мг / кг / день), и затем вводился каждые 12 ч в течение 2 дней (рис. 2b). Висцеральные органы (печень (liver) и селезенка (spleen)), взятые в конце эксперимента, показали значительное снижение бактериальной нагрузки у мышей, получавших рибавирин. По оси ординат отложены числа колониеобразующих единиц *Salmonella typhi* и было показано, что рибавирин ингибирует вирулентность *Salmonella typhi in vivo*, а также *in vitro*.

Учитывая вышесказанное, возможная антимикробная активность таких неантибиотических препаратов, как рибавирин, подчеркивает необходимость нейтрализации их активности при проведении испытаний микробиологической чистоты фармацевтических препаратов [5].

Авторами настоящей работы была выявлена антимикробная активность рибавирина в отношении 2-х тест-микроорганизмов — *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* (рис.3). Как видно из рисунка, при повышении концентрации рибавирина от 6 мг/мл до 9 мг/мл диаметр зоны угнетения возрастает, причем при достижении уже 8 мг/мл эффект достигает максимального значения и при дальнейшем увеличении концентрации

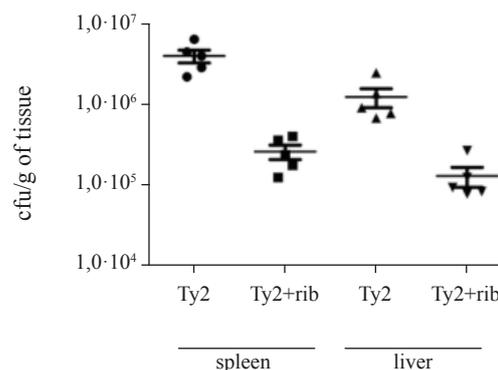


Рис. 2b. Изменение количества бактерий в селезенке и в печени мышей после введения рибавирина [4].

Fig. 2b. Change in the number of bacteria in the spleen and in the liver of mice after administration of ribavirin [4].

изменяется не значительно. Таким образом, можно предположить, что повышение концентрации рибавирина выше 9 мг/мл для предотвращения роста *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* является нецелесообразным.

Совокупность исследований, проведенных по выявлению антибактериальной активности рибавирина, показывает, что его активность проявляется при достаточно низких концентрациях, существенно ниже терапевтических доз, как правило, составляющих около 75 мг/мл (крем Девирс). Это позволяет рассматривать данный препарат в качестве потенциального антибактериального средства в составе комплексных терапий.

В таблице 2 представлены данные, полученные при изучении антимикробной активности водных растворов рибавирина и водных 0,1% нанодисперсий оксида цинка.

Из результатов, представленных в таблице, следует, что ни один из образцов не ингибировал рост *E. coli*. Грубодисперсный образец оксида цинка практически не проявлял антимикробной активности в отличие от нанодисперсий ZnO.

Нанодисперсия с клиновидными частицами ZnO оказала ингибирующее действие только на рост *B. subtilis*, а нанодисперсия со стержнеобразными частицами ZnO была активна в отношении *B. subtilis* и *S. aureus*. Таким образом, антимикробная активность частиц оксида цинка существенным образом зависит как от размера, так и формы его частиц.

В отличие от рибавирина, угнетающего рост *P. aeruginosa* и *C. albicans*, нанодисперсии оксида цинка не проявляют активности против этих микроорганизмов, поэтому нами был предложен состав модельной композиции, включающий оба исследуемых соединения. Результаты санитарно-биологического исследования рабочей поверхности с использованием предложенной антимикробной композиции представлены в табл 3.

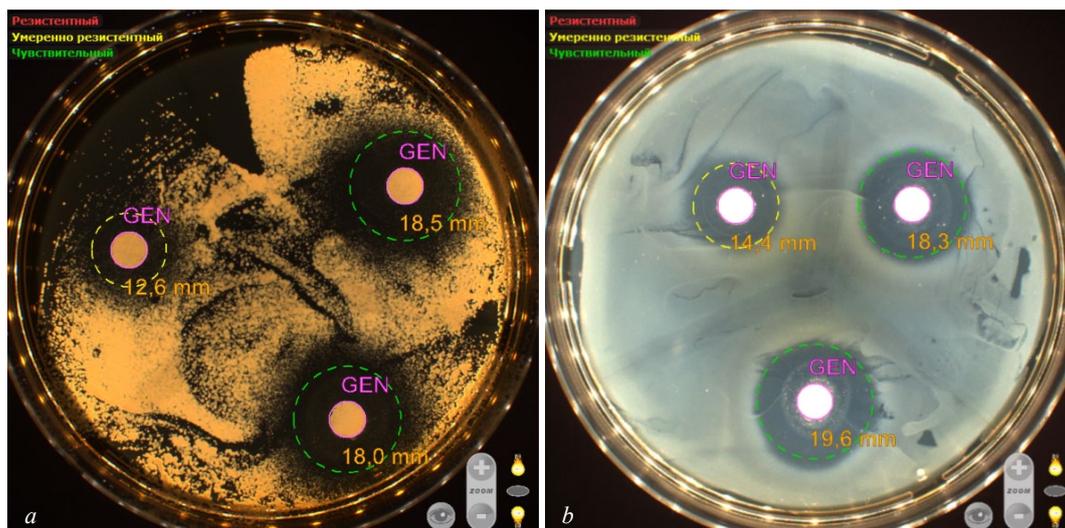


Рис. 3. Зоны ингибирования при концентрациях рибавирина: 6, 8, 9 мг/мл. (а) *Candida albicans*, (б) *Pseudomonas aeruginosa*.

Fig. 3. Inhibition zones at ribavirin concentrations: 6, 8, 9 mg/ml (a) of *Candida albicans*, (b) of *Pseudomonas aeruginosa*.

Таблица 2

Размер зоны ингибирования роста тест-организмов.

The size of the zone of inhibition of growth of test organisms.

Тест организмы	Исследуемый образец*			
	НД1	НД2	ГС	Раствор рибавирина (9 мг/мл)
	Зона ингибирования, мм			
<i>S. aureus</i>	—	15–20	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	5	—	—	17–18
<i>E. coli</i>	—	—	—	—
<i>B. subtilis</i>	10	10–11	5	—
<i>C. albicans</i>	—	—	—	16,5

*НД 1 — нанодисперсия ZnO с клиновидными частицами, НД 2 — нанодисперсия ZnO со стержнеобразными частицами, ГС — грубодисперсная суспензия.

Таблица 3

Результаты санитарно-биологического исследования рабочей поверхности.

The results of sanitary-biological research of the working surface.

Наименование образца	Количество микроорганизмов, выросших в чашках Петри на агаризованной среде
Контрольный образец (дистиллированная вода)	1,85 КОЕ/см ²
Водная дисперсия оксида цинка с содержанием ZnO 0,3% масс.	0,33 КОЕ/см ²
Модельная композиция 1:9 (водная дисперсия оксида цинка с содержанием ZnO 0,3% масс. водный раствор рибавирина с концентрацией 9 мг/мл)	0,30 КОЕ/см ²

ВЫВОДЫ

В ходе проведенных исследований было установлено, что высокодисперсные частицы ZnO диаметром 50–70 нм проявляют антимикробную активность в отличие от грубодисперсного образца с диаметром частиц 50 мкм. Нанодисперсии оксида цинка в сочетании с рибавирином обладают высокой антибактериальной активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность руководителю микробиологической лаборатории ФБГУ «ИМЦЭУ АОСМП» Росздравнадзора А.В. Булычевой и студентке РХТУ им. Д.И. Менделеева А. Аверьяновой за помощь в проведении исследований антимикробной активности рибавирина.

ФИНИНСИРОВАНИЕ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РХТУ им. Д.И. Менделеева. Номер проекта К-2020-024.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузовкова А.А., Большаков А.П., Калмыков А.Г. и др. Влияние условий синтеза на свойства гидрозоля оксида цинка. *Химическая технология*. 2012, 13, (5), 268–272.
2. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001, 358, 958–65
3. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Search of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs *Acta Pol Pharm*, 2002, 59 (6), 436-439.
4. Mandal, R. S. et al. Ribavirin suppresses bacterial virulence by targeting LysR-type transcriptional regulators. *Sci. Rep.* 6, 39454; doi: 10.1038/srep39454 (2016).
5. Clonts L.: in *Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation approaches and global requirements*, Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove 1998.

Antimicrobial Composition based on Highly Dispersed Zinc Oxide and Ribavirin

G.T. STADNIUK^{1*}, K.I. KIENSKAYA¹, I.A. BELOVA¹, M.V. SARDUSHKIN², I.A. BUTOROVA², A.N. KUSKOV², O.V. ULYBINA¹, and N. Yu. GUZNOVA³

¹ Dept. of Colloidal Chemistry, Faculty of Natural Science, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Mendeleev University), Moscow, 125047 Russia

² Dept. of Technology of Chemical, Pharmaceutical and Cosmetic Products, Faculty of Chemical Pharmaceutical Technologies and Biomedical Preparations, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia

³ VIRMED Polyclinic, Tula, 300028 Russia

*e-mail: mazi-tova@mail.ru

Received February 28, 2020

Revised March 20, 2020

Accepted July 24, 2020

Abstract—Nanodispersions of zinc oxide with wedge-shaped and rod-shaped particles have been synthesized. The dependence of the antimicrobial activity of ZnO particles on their size and shape was studied. It was found that rod-shaped particles have a higher antimicrobial activity against a number of test microorganisms. In addition to the antiviral, antibacterial activity of ribavirin was detected. The structure of the antimicrobial composition of a wide spectrum of action was proposed.

Key words: nanoparticles, zinc oxide, ribavirin, antimicrobial and antibacterial activity

Acknowledgments—The authors are deeply grateful to A.V. Bulycheva, Head of the Laboratory of Microbiology, Federal State Institution “IMTSEU AOSMP”, Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor), and to A. Averyanova, student of the Mendeleev University, for her help in analyzing the ribavirin antimicrobial activity.

Funding—The work was supported by Mendeleev University of Chemical Technology of Russia. Project Number K-2020-024.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-94-98