

М. В. Соловский<sup>1</sup>, М. Ю. Еропкин<sup>2</sup>, Е. М. Еропкина<sup>2</sup>, М. Ю. Смирнова<sup>1</sup>,  
И. И. Гаврилова<sup>1</sup>

## КОМПЛЕКСЫ АНТИБИОТИКОВ-АМИНОГЛИКОЗИДОВ С СОПОЛИМЕРАМИ АКРИЛАМИДА С АКРИЛОВОЙ И С МЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТАМИ

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> ГУ НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Синтезированы полимерные комплексы антибиотиков-аминогликозидов в форме оснований с низкомолекулярными водорастворимыми сополимерами акриламида (АА) с акриловой (АК) и метакриловой (МАК) кислотами, содержащими 15 – 20 мол.% карбоксильных групп. Установлено, что комплексы антибиотиков с сополимерами АА-МАК являются более стабильными в водных и водно-солевых растворах и *in vitro* менее токсичными, чем комплексы на основе сополимеров АА-АК. Все полимерные комплексы сохраняют высокий уровень антибактериальной активности.

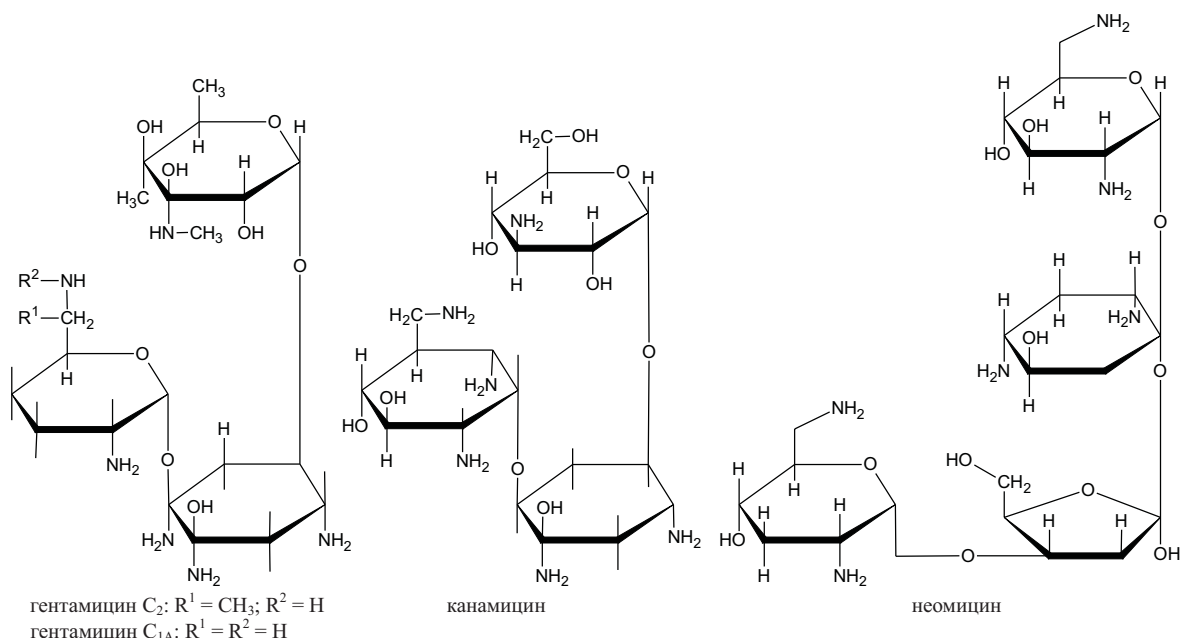
**Ключевые слова:** полимерные комплексы, аминогликозидные антибиотики, сополимеры акриламида, акриловая и метакриловая кислота, токсичность *in vitro*, антимикробная активность.

Антибиотики аминогликозидного ряда — структурно родственные соединения, обладающие высоким уровнем и широким спектром антимикробного действия [1]. Вместе с тем для них характерно проявление выраженной токсичности при использовании в лечебных целях, в частности ото- и нефротоксичность, способность вызывать нервно-мышечную блокаду. Поэтому применение аминогликозидных антибиотиков в клинике проводят при постоянном контроле пиковых и остаточных концентраций в крови, что практически неудобно. В связи с этим возникает проблема снижения токсичности антибиотиков-аминогликозидов.

Известно [2, 3], что одним из эффективных способов снижения токсичности ионогенных биологически активных веществ (БАВ) при сохранении биоспецифической активности является их комплексообразова-

ние с нетоксичными полиэлектролитами. В литературе описаны водорастворимые полимерные комплексы канамицина и гентамицина на основе карбоксиметилового и сульфопропилового эфира декстрана, обладающие высокой активностью, однако об их токсикологических характеристиках не сообщается [4].

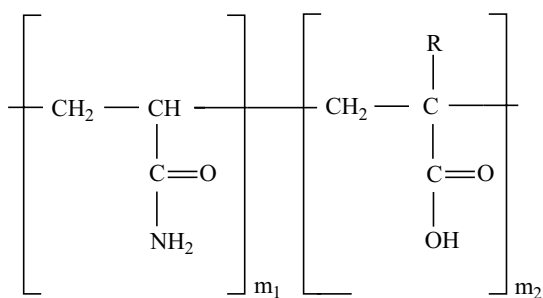
Цель данной работы — получение и исследование физико-химических, токсических и антимикробных свойств комплексов аминогликозидных антибиотиков с синтетическими низкомолекулярными анионными сополимерами-носителями. В качестве таких носителей были синтезированы водорастворимые сополимеры акриламида (АА) с акриловой (АК) и с метакриловой (МАК) кислотами. Интерес к сополимерам АА с АК и АА с МАК обусловлен их доступностью, а также и тем обстоятельством, что, согласно литературным дан-



ным [5], полиакриламид не токсичен для теплокровных животных. Кроме того, эти сополимеры различаются по микроструктуре полимерных цепей (по локальной плотности заряженных групп на них) [6], что может отразиться на комплексообразующей способности сополимеров по отношению к катионным БАВ. В качестве модифицируемых аминокликозидных антибиотиков были выбраны широко применяемый в клинике гентамицин, канамицин, антимиicrobialный спектр которого включает микобактерии туберкулеза, и неомицин, который из-за своей высокой токсичности не разрешен для парентерального применения.

На предварительном этапе работы сульфаты гентамицина, канамицина и неомицина переводили в основание обычным методом и получали соответственно ГО, КО и НО.

Сополимеры-носители синтезировали методом радикальной гетерофазной сополимеризации АА с АК (МАК) в пропан-2-оле, известном регуляторе молекулярной массы (ММ) полиакриламида, в смеси пропан-2-ол – этанол, 1:1, а также в этаноле, использовали азо(бисизобутиронитрил) в качестве инициатора. Результаты опытов по сополимеризации АА с непредельными кислотами, приведены в табл. 1. Видно, что во всех исследованных системах в ходе сополимеризации с количественным выходом образуются низкомолекулярные сополимеры АА-АК и сополимеры АА-МАК, содержащие 15,1 – 20,1 мол.% звеньев непредельной кислоты  $m_2$ .



I: R = H; II: R = CH<sub>3</sub>

Как следует из данных табл. 1, ММ образующихся сополимеров уменьшаются со снижением концентрации сомономеров в исходной реакционной смеси [ $M_1 + M_2$ ] (опыты 3 и 2), с повышением концентрации инициатора (опыты 2 и 1), а также при переходе от проведения процесса в этаноле к сополимеризации в смеси этанол + пропан-2-ол или в пропан-2-оле (опыты 7 – 5). Важным результатом работы являлось получение низкомолекулярных ( $M_w = 19000 - 29000$  Да) сополимеров АА (I и II), что связано с необходимостью их полного выведения из организма, поскольку они являются бионедegradуемыми.

Помимо функционального анализа (титрование карбоксильных групп), строение сополимеров I и II было подтверждено методом ИК-спектроскопии. В ИК-спектрах сополимеров I и II, в отличие от ИК-спектра поли-АА, появляется полоса поглощения в области  $2580 \text{ см}^{-1}$ , отвечающая валентным колебаниям гидроксильной карбоксильных групп.

Комплексообразование ГО, КО, НО с сополимерами I и II изучали методом равновесного диализа и вискозиметрии. Равновесный диализ полимерных комплексов антибиотиков-аминогликозидов, проведенный в статических условиях при  $37^\circ\text{C}$ , позволил определить связывание ГО и НО с карбоксилсодержащими сополимерами АА и степени связывания  $Q$  антибиотиков сополимерами как в воде, так и в изотоническом растворе (табл. 2). В случае комплексов ГО с сополимерами I-2 и II-2 близкого состава и одинаковыми ММ наибольшим показателем связывания и значениями  $Q$  характеризовался более стабильный комплекс на основе сополимера АА-МАК с повышенной плотностью заряженных групп на цепи сополимера. Увеличение ионной силы раствора приводило к уменьшению величины сорбции и значений  $Q$ , что указывает на преобладающий электростатический характер взаимодействия аминокликозидов с сополимерами I и II. Тем не менее в равновесных условиях в изотоническом растворе 40 – 50 % антибиотика входило в состав полимерного комплекса.

В табл. 3 представлены значения приведенной вязкости  $\eta_{пр}$  растворов полимерных комплексов ГО и КО равных концентраций ( $\approx 0,90 \text{ г/дл}$ ) в воде и в 3 М водном растворе мочевины, разрушающей водородные связи. Как видно из табл. 3, при переходе от воды к растворам мочевины приведенная вязкость растворов комплексов ГО и КО заметно возрастает в силу уменьшения их компактности в результате разрыва водородных связей, возникших между молекулами антибиотика и полимера-носителя при комплексообразовании. Тем самым было показано, что исследованные ионные комплексы ГО и КО с сополимерами I и II стабилизированы водородными связями. Из представленных в табл. 4 данных видно, что полимерные комплексы ГО, КО и НО на основе сополимеров АА-МАК характеризуются существенно (в 1,5 – 3 раза) меньшим значением характеристической вязкости  $[\eta]$  по сравнению со значениями  $[\eta]$  исходного сополимера-носителя. В то же время для комплексов исследованных аминокликозидных антибиотиков с сополимерами АА-АК такого явления не обнаружено (табл. 4). Это указывает на то, что комплексы антибиотиков на основе сополимеров АА-МАК имеют более компактную структуру макромолекулярных клубков в водно-солевых растворах, содержащих солевые связи внутри компактного клубка, и характеризуются большей стабильностью.

Токсичность аминокликозидных антибиотиков и их полимерных комплексов определяли путем изучения их цитотоксического действия *in vitro* в культуре фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Токсичность оценивали по их влиянию на активность митохондриальных дыхательных ферментов, являющихся тестом на жизнеспособность этих клеток. Показателем цитотоксичности препаратов служили значения их среднеингибиторной концентрации ( $IC_{50}$ ), подавляющей активность дыхательных ферментов ФЛЭЧ на 50 % по сравнению с интактным контролем.

Гетерофазная сополимеризация АА ( $M_1$ ) с АК или с МАК ( $M_2$ ) при 50 °С

Опыт	$M_2$	Исходная реакционная смесь			Растворитель	Сополимер $M_1 - M_2$			
		$[M_2]$ , мол. %	$[M_1 + M_2]$ , масс. %	$[AIBN]$ , масс. %		Обозначение	Выход, %	$m_2$ , мол. %	$M_w$ , Да
1	АК	15	20	4,5	Пропан-2-ол	I-1	99,6	15,1	12 000
2	АК	20	20	3,0	Пропан-2-ол	I-2	99,8	20,1	19 000
3	АК	20	30	3,0	Пропан-2-ол	I-3	99,5	19,8	27 000
4	МАК	15	30	3,0	Пропан-2-ол	II-1	99,9	15,0	20 000
5	МАК	20	30	3,0	Пропан-2-ол	II-2	99,7	19,2	19 000
6	МАК	20	30	3,0	Пропан-2-ол + этанол (1:1)	II-3	99,1	19,0	25 000
7	МАК	20	30	3,0	Этанол	II-4	99,6	19,3	29 000

Таблица 2

Равновесный диализ полимерных комплексов ГО (~ 15 масс. % ГО) и НО (~ 20 масс. % НО) при 37 °С

Комплекс	$H_2O$		0,9 % раствор NaCl	
	Связывание, мг/г	$Q$ , %	Связывание, мг/г	$Q$ , %
Сополимер АА-МАК II-2 + ГО	137	75,5	88,2	49,8
Сополимер АА-АК I-2 + ГО	101	54,2	70,0	36,7
Сополимер АА-АК I-2 + НО	179	79,7	122,2	57,3

Как видно из табл. 5, НО, ГО и КО обладают высокой цитотоксичностью ( $IC_{50}$  4,2 – 7,2 мг/мл). Эти результаты согласуются с литературными данными, показывающими, что токсичность представленных антибиотиков убывает при переходе неомидин → гентамицин → канамицин [7]. Токсичность изучаемых полимерных комплексов аминогликозидных антибиотиков существенно ниже. При этом независимо от строения антибиотика (ГО, КО, НО) наибольшим значением  $IC_{50}$  (наименьшей цитотоксичностью) характеризуются комплексы с сополимерами АА-МАК. Это находится в полном соответствии с результатами физико-химических исследований комплексов, поскольку образование более стабильного комплекса аминогликозидный антибиотик – сополимер АА-МАК способствует постепенному отщеплению антибиотика из комплекса и проникновению в клетки человека, это и обеспечивает снижение токсичности антибиотика. В то же время в результате кооперативного взаимодействия полимера с бактериальной клеткой локальная концентрация антибиотика на её поверхности существенно воз-

растает, что ведет к увеличению эффективности его антимикробного действия. Ещё одним фактором, определяющим преимущественное воздействие полимерных комплексов на микробные, а не на эукариотические клетки, являются существенные различия липидного состава их плазматических мембран.

Анализ значений минимальных подавляющих концентраций препаратов в отношении стандартных штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, приведенных в табл. 5, показывает, что все исследованные полимерные комплексы сохраняют высокий уровень антимикробной активности, присущий немодифицированным полимерами антибиотикам.

#### Экспериментальная химическая часть

Акриламид дважды перекристаллизовывали из этилацетата. АК и МАК очищали двукратной перегонкой в вакууме. Физико-химические константы всех мономеров соответствовали литературным данным. АИБН трижды перекристаллизовывали из смеси хлороформ – этанол, 1:5. В работе использовали сульфаты гентамицина, неомидина и канамицина. Для получения антибиотиков в форме основания водные растворы их сульфатов пропускали через колонку с анионитом ЭДЭ-10 П в  $OH^-$  форме и выделяли сублимационной сушкой. Абсолютизированный пропан-2-ол, этанол ректификат и ацетон о. с. ч. использовали без дополнительной очистки.

Анионные сополимеры АА получали ампульным методом, проводя сополимеризацию АА с АК (МАК) в атмосфере аргона. Полученную массу высадили в ацетон, выделенный продукт отфильтровали и высушили в вакууме. Состав сополимеров определяли по данным потенциометрического титрования  $COOH$

Таблица 3

Приведенная вязкость растворов полимерных комплексов антибиотиков-аминогликозидов

Комплекс	Концентрация комплекса, г/дл	$\eta_{sp}$ при 25 °С, дл/г	
		Вода	3М раствор мочевины в воде
Сополимер АА-МАК II-2 + ГО	0,89	0,12	0,25
Сополимер АА-АК I-2 + ГО	0,92	0,30	0,46
Сополимер АА-АК I-2 + НО	0,92	0,27	0,38

Полимерные комплексы гентамицина, канамицина и неомицина оснований

Полимер-носитель			Антибиотик	Полимерный комплекс		
Обозначение	<i>m</i> , мол.%	[η], дл/г		Выход, %	Содержание антибиотика, масс.%	[η], дл/г
Сополимер АА-АК (I-2)	20,1	0,32	ГО	80,2	16,1	0,33
Сополимер АА-МАК (II-2)	19,2	0,33	ГО	91,5	16,3	0,21
Сополимер АА-МАК (II-2)	19,2	0,33	НО	81,2	15,3	0,11
Сополимер АА-МАК (II-2)	19,2	0,33	КО	88,5	14,3	0,20
Сополимер АА-АК (I-2)	20,1	0,32	КО	90,3	14,6	0,32

Таблица 5

Цитотоксическая и антибактериальная активность полимерных комплексов антибиотиков-аминогликозидов

Препарат (обозначение)	Содержание антибиотика, масс.%	IC <sub>50</sub> , мг/мл	МПК, мкг/мл	
			<i>Staphylococcus aureus</i> VT209P	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922
Комплекс сополимер АА-АК + КО	14,3	11,85 ± 1,29	0,15	15
Комплекс сополимер АА-МАК + КО	14,3	17,18 ± 1,31	0,15	15
Комплекс сополимер АА-АК + ГО	16,1	10,58 ± 0,82	0,30	0,6 – 1,25
Комплекс сополимер АА-МАК + ГО	16,3	15,07 ± 0,85	0,02	0,6 – 1,25
Комплекс сополимер АА-АК + НО	13,8	10,77 ± 0,93	0,02	0,6 – 1,25
Комплекс сополимер АА-МАК + НО	15,3	18,70 ± 0,20	0,02	0,6 – 1,25
КО	100	7,17 ± 0,69	0,02	10
ГО	100	4,44 ± 1,22	0,02	0,3 – 0,6
НО	100	4,19 ± 0,29	0,02	1,25 – 2,50

групп. Характеристическую вязкость [η] сополимеров I и II измеряли в вискозиметре Уббелодде в 1 н. растворе NaNO<sub>3</sub> в воде при 30 °С. Среднемассовые молекулярные массы сополимеров M<sub>w</sub> рассчитывали по формуле  $[\eta] = 3,73 \times 10^{-4} \times M_w^{0,66}$ , известной для поли-АА [8].

ИК-спектры поли-АА и полученных сополимеров АА снимали на спектрометре Bruker IFS в таблетках с KBr.

Комплексообразование анионных сополимеров АК с антибиотиками-основаниями проводили в воде при массовом соотношении антибиотик – сополимер, 1:5(7). Добавлением в раствор комплекса 0,1 н. раствора NaOH pH целевого раствора доводили до значений 7,2 – 7,6 и подвергали его сублимационной сушке. Выход продукта 80 – 95 %. Содержание антибиотиков в полимерных производных определяли методом УФ-спектроскопии путем комплексообразования их с тринитробензолсульфокислотой (ТНБС) согласно методике [9]. УФ-спектры водных растворов полимерных комплексов антибиотиков с ТНБС записывали на спектрофотометре Specord M 40 в кюветах с толщиной слоя 1 см. Равновесный диализ полимерных комплексов КО, ГО, НО изучали по ранее описанному способу [10].

### Экспериментальная биологическая часть

Цитотоксическое действие изучали в культуре ФЛЭЧ с использованием метода восстановления тетразолиевого красителя резазурина [11]. Значения IC<sub>50</sub> для аминогликозидных антибиотиков и их полимерных комплексов вычисляли по уравнениям линейной регрессии.

Антимикробную активность определяли в жидкой питательной среде (бульоне Мюллера – Хинтона). Тест-культуры — стандартные штаммы *Staphylococcus aureus* VT 209 P и *Escherichia coli* ATCC 25922. Бактерии выращивали 18 ч. Микробная нагрузка составляла 500 000 микробных клеток в 1 мл разведенного в жидкой среде препарата.

### ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Лобусева, В. П. Позднякова, А. А. Фирсов и др., *Антибиот. мед. биотехнол.*, **30**(1), 55 – 61 (1985).
2. М. В. Соловский, Г. Е. Афиногенов, Е. Ф. Панарин и др., *Хим.-фарм. журн.*, **25**(4), 40 – 43 (1991).
3. Е. Ф. Панарин, *Полимеры и медицина*, **1**(1), 20 – 24 (2003).
4. А. Д. Вирник, К. П. Хомяков, И. Ф. Скокова, *Успехи химии*, **44**(7), 1280 – 1307 (1975).
5. М. Н. Савицкая, Ю. Д. Холодова, *Полиакриламид*, Техника, Киев (1969), сс. 34 – 35.
6. М. В. Соловский, Е. Л. Шульцева, И. И. Гаврилова и др., *Пластмассы со специальными свойствами: Межвузовский сборник научных трудов*, СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург (2006), сс. 77 – 80.

7. В. Г. Черников, С. М. Терехов, Т. Б. Крохина и др., *Бюл. экперим. биол. мед.*, **128**(1), 117 – 120 (2003).
8. В. А. Каргин (ред.), *Энциклопедия полимеров*, Т. 1, Советская энциклопедия, Москва (1972), сс. 29 – 32.
9. S. Z. Snyder, P. Z. Sobocinski, *Anal. Biochem.*, **64**(2), 284 – 288 (1975).
10. М. В. Соловский, Н. В. Никольская, Н. А. Заикина, *Хим-фарм. журн.*, **36**(2), 9 – 13 (2002).
11. М. Ю. Еропкин, М. В. Соловский, Е. М. Еропкина и др., *Токсикол. вестн.*, **15**(5), 18 – 22 (2006).

Поступила 02.10.07

## AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTIC COMPLEXES WITH COPOLYMERS OF ACRYLAMIDE WITH ACRYLIC AND METHACRYLIC ACIDS.

M. V. Solovskii<sup>1</sup>, M. Yu. Eropkin<sup>2</sup>, E. M. Eropkina<sup>2</sup>, M. Yu. Smirnova<sup>1</sup>, and I. I. Gavrilova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Influenza, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Prof. Popova 15/17, St. Petersburg, 197376, Russia;

The physicochemical and biological properties of polymer complexes of gentamicin, kanamycin and neomycin in the form of bases with low-molecular water-soluble copolymers of acrylamide (AA) with acrylic (A) and methacrylic (MA) acids containing 15 – 20 mol.% carboxyl groups have been studied for the purpose reducing the toxicity of aminoglycoside antibiotics. It is established that the complexes of antibiotics with AA – MA copolymers are characterized by higher stability in aqueous and aqueous-salt solutions and exhibit a significantly lower cytotoxicity *in vitro* on the culture of fibroblast of the lung of human embryo than complexes based on AA – A copolymers. The complexes are also less toxic in comparison to the initial antibiotics. Polymer complexes studied retain a high level of the antibacterial activity inherent in antibiotics nonmodified by polymers.

**Key words:** polymer complexes, aminoglycoside antibiotics, copolymers of acrylamide with acrylic and methacrylic acids, toxicity *in vitro*, antimicrobial activity