

ИЗУЧЕНИЕ ДЕПОНИРОВАНИЯ ГЕНТАМИЦИНА В СОСТАВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С АЛЬБУМИНОМ

^{1,2}Миронова Т.Е., ^{2,3}Афонюшкин В.Н., ¹Сигарева Н.А.,

³Троменшлегер И.Н., ⁴Харченко А.В.

¹Новосибирский государственный аграрный университет

Новосибирск, Россия

²Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук

Новосибирская область, р.п. Краснообск, Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения

Российской академии наук

Новосибирск, Россия

⁴Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии

им. Я.Л. Цивьяна

Новосибирск, Россия

Для цитирования: Миронова Т.Е., Афонюшкин В.Н., Сигарева Н.А., Троменшлегер И.Н., Харченко А.В. Изучение депонирования гентамицина в составе целлюлозы с альбумином // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49. № 5. С. 61–66. DOI: 10.26898/0370-8799-2019-5-8

For citation: Mironova T.E., Afonyushkin V.N., Sigareva N.A., Tromenshleger I.N., Kharchenko A.V. Izuchenie depoinirovaniya gentamitsina v sostave tsellyulozy s al'buminom [Study of gentamicin deposition in cellulose with albumin] *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* [Siberian Herald of Agricultural Science], 2019, vol. 49, no. 5, pp. 61–66. DOI: 10.26898/0370-8799-2019-5-8

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Изучены способы связывания антибактериальных препаратов с поверхностью целлюлозы без применения окислителей для предотвращения возникновения раневой инфекции. Исследована иммобилизация гентамицина в комплексе частично денатурированного альбумина в составе с бактериальной целлюлозой. Исследование проводили на образцах целлюлозы, синтезируемой *Gluconacetobacter hansenii*. В качестве связующего компонента использован альбумин. Им пропитывали образцы целлюлозы, которые затем подвергали денатурации. При помощи ПЦР-амплификатора CFX (BioRad) подбирали оптимальную температуру денатурации. Оценка эффективности иммобилизации альбумина в толще целлюлозы проводили путем его окрашивания люминисцентным красителем SYPRO® Ruby Protein Gel Stain с последующей детекцией при помощи трансиллюминатора. В качестве контроля использовали бактериальную целлюлозу, пропитанную неденатурированным альбумином. Иммобилизация альбумина в составе бактериальной целлюлозы отмечена при темпера-

STUDY OF GENTAMICIN DEPOSITION IN CELLULOSE WITH ALBUMIN

^{1,2}Mironova T.E., ^{2,3}Afonyushkin V.N.,

¹Sigareva N.A., ³Tromenshleger I.N.,

⁴Kharchenko A.V.

¹Novosibirsk State Agrarian University

Novosibirsk, Russia

²Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences

Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Novosibirsk, Russia

⁴Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsivyan

Novosibirsk, Russia

Methods of binding antibacterial drugs to the surface of cellulose without the use of oxidizing agents to prevent the occurrence of wound infections have been studied. The immobilization of gentamicin in the complex of partially denatured albumin in the composition with bacterial cellulose has been analyzed. The study was carried out on samples of cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii*. Albumin served as a binding agent, which was used to impregnate cellulose samples, which were then denatured. Using PCR amplification CFX (BioRad), the optimal denaturation temperature was selected. The effectiveness of the immobilization of albumin in the thickness of the cellulose was assessed by staining it with the luminescent dye SYPRO® Ruby Protein Gel Stain, followed by

туре 65–95 °С. Антибактериальную активность комплекса «целлюлоза + альбумин + гентамицин» оценивали с использованием тест-штамма бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Угнетение роста тест-штамма бактерий наблюдали во всех тестах с бактериальной целлюлозой с комплексом частично денатурированного альбумина и гентамицина. В контрольных образцах, в которых гентамицин не был иммобилизован в составе частично денатурированного альбумина, зоны задержек роста *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 не отмечены. Сделан вывод о том, что путем частичной денатурации альбумина возможно проводить задержку антибактериальных препаратов в толще бактериальной целлюлозы для дальнейшего их высвобождения. Предложен новый вариант материала, пригодного для изготовления имплантов, повязок на основе геля бактериальной целлюлозы с антибактериальными свойствами. Повязки на основе композита бактериальной целлюлозы, альбумина и гентамицина наиболее актуальны для лечения ожогов. Наличие гентамицина в их составе также актуально для профилактики бактериальных инфекций.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, биопленки, антибиотики, иммобилизация антибиотиков, альбумин, денатурация

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии многих родов синтезируют бактериальную целлюлозу. К ее особенностям можно отнести прочность и пористость в совокупности с эластичностью; схожесть бактериальной целлюлозы с клетками и тканями живого организма, а следовательно, биологическую совместимость. Бактериальная целлюлоза не вызывает аллергических реакций и не отторгается организмом [1–5]. Целлюлозу, синтезируемую бактериями, применяют во многих областях – медицине, ветеринарии и биотехнологиях. Для задач биомедицины бактериальную целлюлозу используют во влажном состоянии, в котором она напоминает гель, а по механическим свойствам – мягкие ткани живых организмов¹ [6–9].

transilluminator detection. Bacterial cellulose impregnated with undenatured albumin was used as a control. Albumin immobilization in bacterial cellulose was observed at temperatures of 65–95 °C. The antibacterial activity of the complex “cellulose + albumin + gentamicin” was evaluated using a test strain of bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The growth inhibition of the test strain of bacteria was observed in all tests with bacterial cellulose in combination with partially denatured albumin and gentamicin. In control samples, in which gentamicin was not immobilized as part of partially denatured albumin, growth inhibition zones of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were not noted. It was concluded that by partial denaturation of albumin it is possible to delay antibacterial drugs in the thickness of bacterial cellulose for their further release. A new version of the material suitable for the production of implants and bandages based on bacterial cellulose gel with antibacterial properties is proposed. Dressings based on a composite of bacterial cellulose, albumin and gentamicin are most relevant for the treatment of burns. The presence of gentamicin in their composition is also relevant for the prevention of bacterial infections.

Keywords: bacterial cellulose, biofilms, antibiotics, immobilization of antibiotics, albumin, denaturation

Бактериальную целлюлозу применяют в качестве кровоостанавливающих средств, для протезирования кровеносных сосудов, лечения ожогов, пролежней и травм различного происхождения. Существует опасность возникновения раневой инфекции, например при размножении бактерий ее на поверхности. В связи с этим проводят исследования по разработке бактериальной целлюлозы, обладающей антибактериальными свойствами [10–12].

В настоящее время существуют различные методы связывания лекарственных препаратов с поверхностью бактериальной целлюлозы, например с применением различных окислителей, таких как перекись водорода, перманганат натрия, оксид азота, перйодат натрия и др. Многие окислители

¹Константинов К.Н., Пестов Н.А. ТЕМПО-окисление бактериальной целлюлозы // Материалы XXI науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов. М., 2017. С. 12–16.

вызывают деструкцию бактериальной целлюлозы, нарушая ее важные свойства. Ранее мы занимались изысканиями способов связывания антибактериальных препаратов с поверхностью целлюлозы без применения окислителей [6, 13, 14].

Цель исследования – изучить иммобилизацию гентамицина в комплексе частично денатурированного альбумина в составе с бактериальной целлюлозой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стала бактериальная целлюлоза, синтезируемая бактерией *Gluconacetobacter hansenii*. Эксперимент проводили следующим образом: кусочки бактериальной целлюлозы $0,5 \times 0,5$ см поместили в 24-луночный микропланшет, в каждую лунку внесли по 100 мкл 10%-го альбумина. Пропитывали целлюлозу в течение суток. Затем проводили денатурацию альбумина в течение часа в восьми температурных диапазонах: 65; 65,7; 67; 69; 71,4; 73,4; 74,5; 75 °C.

Для этого использовали ПЦР амплификатор CFX (BioRad) в режиме температурного градиента. К образцам добавили раствор гентамицина (40 мг/мл) и инкубировали 24 ч. Все квадраты отмывали от неиммобилизованного гентамицина и альбумина физиологическим раствором трехкратно по

30 мин. В качестве контроля использована целлюлоза, подготовленная аналогичным методом, не прошедшая этапы денатурации.

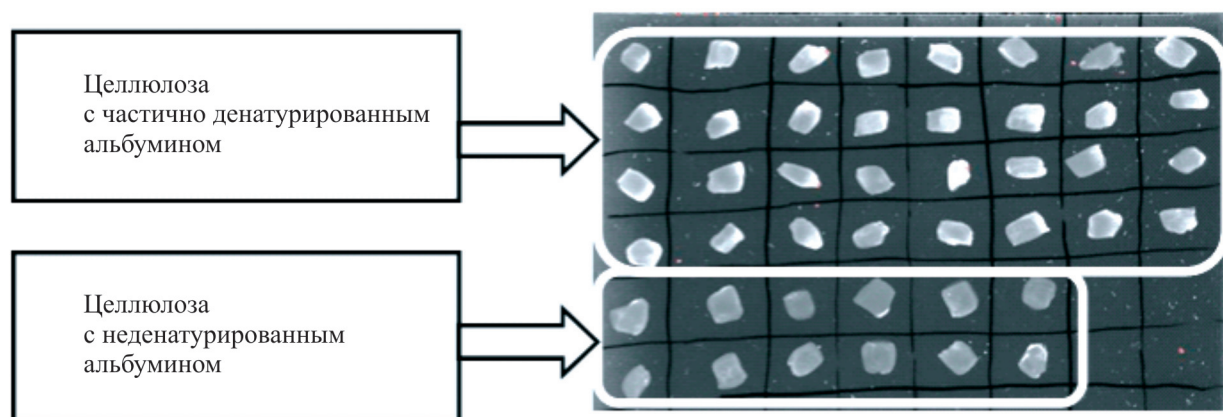
Для того чтобы оценить эффективность иммобилизации альбумина, кусочки целлюлозы окрасили с помощью SYPRO® Ruby Protein Gel Stain. Краситель удаляли через 20 мин и проводили детекцию с помощью трансиллюминатора.

Антибактериальная активность конъюгата целлюлозы с антибиотиком исследована по способности подавлять рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на Эюгеник агаре. Кусочки целлюлозы помещали в чашки Петри, которые инкубировали в термостате при 37 °C в течение 24 ч.

В качестве контроля использовали целлюлозу, приготовленную по аналогичной методике, альбумин которой не подвергали денатурации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи трансиллюминатора проводили детекцию исследуемых образцов совместно с контрольными (см. рисунок). Благодаря флюоресцентному интеркалирующему красителю, специфически связывающемуся с белками, наблюдали флюоресценцию квадратов бактериальной целлюлозы 1–4-го рядов. Данные образцы целлюлозы содержали частично денатурированный альбумин.



Снимок кусочков бактериальной целлюлозы с альбумином, частично денатурированным в градиенте температур 65–70 °C (осуществлен с помощью трансиллюминатора, окраска SYPRO® Ruby Protein Gel Stain)

Snapshot of pieces of bacterial cellulose with albumin partially denatured in a temperature gradient of 65–70 °C (carried out using a transilluminator stained with SYPRO® Ruby Protein Gel Stain)

В рядах 5 и 6, являвшимися контрольными, также отмечали свечение, но его интенсивность была меньше, чем у экспериментальных образцов из рядов 1–4. Это указывает на то, что в толще целлюлозы контрольной группы задержалось небольшое количество альбумина. Нижние ряды образцов целлюлозы содержали неденатурированный альбумин. Низкий уровень флуоресценции свидетельствует об удалении неденатурированного альбумина в процессе отмывки.

Таким образом, флуоресценция образцов целлюлозы с частично денатурированным альбумином свидетельствует о большем количестве альбумина, иммобилизованном в геле бактериальной целлюлозы. Явной зависимости между температурой, при которой проводили денатурацию, и степенью светимости не выявлено.

При исследовании антибактериальной активности конъюгата целлюлозы с антибиотиком по способности подавлять рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на Эгоники агаре по прошествии 24 ч отмечены зоны задержек роста (см. таблицу).

Можно сделать вывод, что при частичной денатурации альбумин иммобилизуется в геле бактериальной целлюлозы, происходит обратимое депонирование гентамицина. В дальнейшем после отмывки его высвобождения не происходит.

Благодаря денатурации, альбумин утрачивает способность к диффузии в геле

бактериальной целлюлозы и способность высвобождаться за ее пределы при отмывке. Способность альбумина связывать гентамицин свидетельствует о том, что денатурация является частичной и в составе молекул альбумина сохраняются сайты связывания гентамицина. Иммобилизация гентамицина происходит не за счет ковалентного связывания, поэтому в опыте с культурой стафилококка наблюдали процесс диффузии антибиотика в питательную среду и формирование зон задержки роста.

Зависимости между температурой денатурации и зонами задержек роста бактерий стафилококка не выявлено. Из этого факта следует, что сайты связывания гентамицина не подвергаются температурной денатурации в изученном диапазоне температур и не входят в состав участков молекулы, которые участвуют в процессе агрегации белковых молекул. Термолабильные участки белковой молекулы альбумина под действием температуры обнажают неполярные аминокислотные остатки белковой цепи, что обеспечивает агрегацию молекул альбумина. Агрегированные молекулы альбумина имеют более крупные размеры, что препятствует их высвобождению через поры геля бактериальной целлюлозы.

Подавления роста тест-штамма *S. aureus* ATCC 25923 в чашках Петри, в которых были расположены контрольные образцы, не наблюдали. Можно сделать вывод, что гентамицин в геле бактериальной целлюлозы не задерживается в значимых количествах.

Предложен новый вариант материала, пригодного для изготовления имплантов, повязок на основе геля бактериальной целлюлозы с антибактериальными свойствами. Для имплантов создание депо гентамицина имеет значение для профилактики ранних послеоперационных осложнений в виде хирургических инфекций. По мере заживления хирургической раны риск попадания инфекционных агентов исчезает и необходимость в гентамине отпадает. Повязки на основе композита бактериальной целлюлозы, альбумина и гентамицина наиболее актуальны для лечения ожогов, наличие гентамицина в их составе также актуально для профилак-

Средние значения зон задержек роста бактерий *S. aureus* (M ± SE)

The average values of growth inhibition zones of bacteria *S. aureus* (M ± SE)

№ п/п	Температура, °C	Средние значения зон задержек роста, мм
1	65,0	4,8 ± 0,4
2	65,7	4,3 ± 0,3
3	67,0	5,5 ± 0,3
4	69,0	6,3 ± 0,2
5	71,4	6,5 ± 0,5
6	73,4	6,0 ± 0,03
7	74,5	6,8 ± 0,2
8	75,0	6,0 ± 0,06
Интактный контроль		Задержки роста нет

тики бактериальных инфекций. Регулярная смена повязок в данной ситуации позволяет обеспечить поддержание бактериостатической концентрации гентамицина в зоне повреждения в течение всего курса лечения.

Изготовление композита бактериальной целлюлозы с альбумином с использованием метода температурной денатурации дает возможность сохранить сайты связывания гентамицина и обеспечить депонирование данного антибиотика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пропитывание бактериальной целлюлозы альбумином с последующей его температурной денатурацией в диапазоне 65–95 °C обеспечивает иммобилизацию гентамицина. Угнетение роста бактерий *S. aureus* ATCC 25923 на Эугоник агаре свидетельствует о высвобождении гентамицина из композита бактериальной целлюлозы с термоденатурированным альбумином. Это позволяет рассматривать композиты бактериальной целлюлозы с альбумином и гентамицином не только в качестве материала с антибактериальными свойствами, но и депо этих антибиотиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотова К.С., Чухнин К.С., Майер Л.В. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2016. № 6. С. 153–165.
2. Ларионов П.М., Филипенко М.Л., Ступак В.В., Афонюшкин В.Н., Харченко А.В. Структурный анализ биосинтезированной целлюлозы (наноцеллюлозы) по результатам конфокальной микроскопии // Сибирский научный медицинский журнал. 2016. Т. 36. № 4. С. 5–9.
3. Громовых Т.И., Луценко С.В., Данильчук Т.Н. Перспективы направленного использования бактериальной целлюлозы в медицине // Интер-медикал. 2015. № 7. С. 4–9.
4. Митрофанов Р.Ю., Будаева В.В., Сакович Г.В. Получение и свойства гель-пленки бактериальной целлюлозы // Химия в интересах устойчивого развития. 2010. № 5. С. 587–592.
5. Mormino R.; Bungay H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor // Applied Microbiology and

- Biotechnology. 2003. Vol. 63. N 5-6. P. 503–506.
6. Пиневиц А.В. Чудо-пленки, или слово о бактериальной целлюлозе // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2007. № 3. С. 33–39.
7. Brown A.J. On an acetic ferment forms cellulose // Journal of the Chemical Society. 1986. Vol. 49. P. 432–439.
8. Bäckdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B.R., Risberg B., Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells // Biomaterials. 2006. Vol. 27. P. 2141–2149.
9. Petersen N., Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives // Applied Microbiology and Biotechnology. 2011. Vol. 91. P. 1277–1286.
10. Венгерович Н.Г., Хрипунов А.К., Рузанова Э.А. Исследование возможности применения бактериальной целлюлозы на этапах медицинской эвакуации // Российский биомедицинский журнал MEDLINE.RU. 2014. Т. 15, № 3. С. 620–628.
11. Ткачева Н.И., Морозова С.В., Григорьев И.А., Могнонов Д.М., Колчанов Н.А. Модификация целлюлозы – перспективное направление в создании новых материалов // Высокомолекулярные соединения, серия Б. 2013. Т. 55. № 8. С. 1086–1107.
12. Belgacem M.N., Gandini A. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Amsterdam: Elsevier. 2008. 553 p.
13. Бычковский П.М., Юркитович Т.Л., Адамчик Д.А., Дрепаков Е.Г., Тагиль И.И. Получение полимерных лекарственных форм противоопухолевых веществ на основе окисленной бактериальной целлюлозы // Российский биотерапевтический журнал. 2017. Т. 16. С. 17.
14. Meftahi A., Khajavi R., Rashidi A., Sattari M., Yazdanshenas M.E., Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose // Cellulose. 2010. № 17. P. 199–204.

REFERENCES

1. Bolotova K.S., Chukhnin K.S., Maier L.V. Morfologicheskie osobennosti fibrillyarnoi struktury rastitel'noi i bakterial'noi tsellyulozy [Morphological features of the fibrillar structure of plant and bacterial cellulose]. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Lesnoi zhurnal* [Izvestiya VUZ. Forestry Journal], 2016, no. 6, pp. 153–165. (In Russian).
2. Larionov P.M., Filipenko M.L., Stupak V.V., Afonyushkin V.N., Kharchenko A.V. Struk-

- turnyi analiz biosintezirovannoi tsellyulozy (nanotsellyulozy) po rezul'tatam konfokal'noi mikroskopii [Structural analysis of biosynthesized cellulose based on the results of confocal microscopy]. *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zhurnal* [The Siberian Scientific Medical Journal], 2016, vol. 36, no. 4, pp. 5–9. (In Russian).
3. Gromovych T.I., Lutsenko S.V., Danil'chuk T.N. Perspektivy napravlenogo ispol'zovaniya bakterial'noi tsellyulozy v meditsine [Prospects for the targeted use of bacterial cellulose in medicine]. *Inter-medikal* [Inter-medical], 2015, no. 7, pp. 4–9. (In Russian).
 4. Mitrofanov R.Yu., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Poluchenie i svoystva gel'-plenki bakterial'noi tsellyulozy [Obtaining and properties of gel films of bacterial cellulose]. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya* [Chemistry for Sustainable Development], 2010, no. 5, pp. 587–592. (In Russian).
 5. Mormino R., Bungay H. Composites of bacterial cellulose and paper made with a rotating disk bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 63, no. 5-6, pp. 503–506.
 6. Pinevich A.V. Chudo-plenki, ili slovo o bakterial'noi tsellyuloze [Miracle films, or a word about bacterial cellulose]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta* [Vestnik of Saint Petersburg University], 2007, no. 3, pp. 33–39. (In Russian).
 7. Brown A.J. On an acetic ferment forms cellulose. *Journal of the Chemical Society*, 1986, vol. 49, pp. 432–439.
 8. Вдсдahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B.R., Risberg B., Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp. 2141–2149.
 9. Petersen N., Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 91, pp. 1277–1286.
 10. Vengerovich N.G., Khripunov A.K., Ruzanova E.A. Issledovanie vozmozhnosti primeneniya bakterial'noi tsellyulozy na etapakh meditsinskoj evakuatsii [Research on possibility of application of bacterial cellulose during medical evacuation operations]. *Rossiiskii biomeditsinskii zhurnal. MEDLINE.RU* [Russian Biomedical Journal. Medline.ru], 2014, vol. 15, no. 3, pp. 620–628. (In Russian).
 11. Tkacheva N.I., Morozova S.V., Grigor'ev I.A., Mogonov D.M., Kolchanov N.A. Modifikatsiya tsellyulozy – perspektivnoe napravlenie v sozdanii novykh materialov [Cellulose modification is a promising direction in the creation of new materials перевод]. *Vysokomolekulyarnye soedineniya, seriya B* [Polymer Science. Series B], 2013, vol. 55, no. 8, pp. 1086–1107. (In Russian).
 12. Belgacem M.N., Gandini A. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. Amsterdam: Elsevier. 2008. 553 p.
 13. Bychkovsky P.M., Yurkshtovich T.L., Adamchik D.A., Drepaev E.G., Tagil I.I. Polucheniye polimernykh lekarstvennykh form protivopukholevykh veshchestv na osnove okislennoy bakterial'noy tsellyulozy [Obtaining polymer dosage forms of antitumor substances based on oxidized bacterial cellulose]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* [Russian Journal of Biotherapy]. 2017. T. 16. C. 17. (In Russian).
 14. Meftahi A., Khajavi R., Rashidi A., Sattari M., Yazdanshenas M.E., Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose*, 2010, no. 17, pp. 199–204.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Миронова Т.Е., лаборант-исследователь; e-mail: mironova1994@mail.ru

(✉) **Афонюшкин В.Н.**, кандидат биологических наук, заведующий сектором; **адрес для переписки:** Россия, 630501, Новосибирская область, р.п. Краснообск, а/я 263; e-mail: lisocim@mail.ru

Сigareва Н.А., начальник отдела; e-mail: natalias72@mail.ru

Тромешлегер И.Н., инженер; e-mail: Irina510@ngs.ru

Харченко А.В., врач-нейрохирург

AUTHOR INFORMATION

Mironova T.E., Research Assistant; e-mail: mironova1994@mail.ru

(✉) **Afonyushkin V.N.**, Candidate of Science in Biology, Sector Head; **address:** PO Box 263, SFS-CARAS, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russia; e-mail: lisocim@mail.ru

Sigareva N.A., Sector Head; e-mail: natalias72@mail.ru

Tromenshleger I.N., Engineer; e-mail: Irina510@ngs.ru

Kharchenko A.V., Neurosurgeon

Дата поступления статьи 18.05.2019
Received by the editors 18.05.2019