



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.05.125>

УДК [546.56:541.182.024]+615.33]:579.232:57.088.5

П. В. Сімонов¹, Д. О. Ковальова², Т. О. Буско², О. П. Дмитренко²,
член-кореспондент НАН України М. П. Куліш², М. А. Заболотний²,
М. О. Кузьменко², член-кореспондент НАН України І. С. Чекман¹

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: chekman_ivan@yahoo.co.uk

Взаємодія кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном з білковим, ліпідним та вуглеводним компонентами клітинної оболонки бактерій

Методами квантово-хімічних розрахунків та оптичної спектроскопії досліджено можливість реалізації взаємодії кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном з білковим, ліпідним та вуглеводним компонентами клітинної оболонки грампозитивних та грамнегативних бактерій. Показано, що в розчинах кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном з розглянутими речовинами змінюється положення та напівширина дипольно дозволених смуг оптичного поглинання, що вказує на перебудову електронних станів цефтріаксону, обумовлену посиленням його взаємодії з компонентами клітинної оболонки бактерій за рахунок наявності наночастинок металу.

Ключові слова: цефтріаксон, наночастинок міді, кон'югат, компонент клітинної оболонки бактерій.

Відомо, що ефективність протимікробних лікарських засобів може знижуватися внаслідок виникнення та поширення резистентних до антибіотиків штамів мікроорганізмів [1]. Зокрема, на сьогодні спостерігається поширення стійкості бактерій до цефтріаксону [2].

Цефтріаксон — антибіотик з групи цефалоспоринових третього покоління — є ефективним протимікробним лікарським засобом широкого спектра дії, що знайшов застосування при лікуванні багатьох позалікарняних та внутрішньолікарняних інфекцій. Бактерицидна дія цього засобу обумовлена пригніченням синтезу клітиною стінки грампозитивних та

© П. В. Сімонов, Д. О. Ковальова, Т. О. Буско, О. П. Дмитренко, М. П. Куліш, М. А. Заболотний,
М. О. Кузьменко, І. С. Чекман, 2016

грамнегативних бактерій. До переваг цефтріаксону відносять сприятливий профіль безпеки (співвідношення «ризик/користь»), режим дозування, а також порівняно низьку вартість. Даний антибіотик входить до традиційних схем терапії інфекційних процесів різної локалізації [3–6].

Одним з можливих шляхів вирішення проблеми антибіотикорезистентності є розробка та впровадження в медичну практику протимікробних лікарських засобів нового класу на основі субстанцій наночастинок металів [7, 8]. Такі медикаменти з унікальними фізико-хімічними властивостями та підвищеною біологічною активністю можуть бути одержані, зокрема, шляхом синтезу кон'югатів наноматеріалів з відомими антибіотиками, в тому числі цефтріаксоном [9, 10]. Серед наноструктур вираженою біоцидною дією щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій, вірусів та грибів характеризуються наночастинки міді [11]. При цьому їм властивий сприятливий профіль безпеки, що було показано в дослідженнях *in vitro* та *in vivo* [12–14].

Водночас механізми антибактеріальної дії наночастинок металів, у тому числі міді, а особливо їх кон'югатів з антибіотиками, вивчені недостатньо. У зв'язку з цим доцільним уявляється дослідження перебудови електронних станів у розчинах кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном (НЧМЦ) з компонентами клітинної оболонки бактерій з метою визначення змін у взаємодії субстанції наноматеріалу порівняно з вихідним антибіотиком.

Матеріали та методи. Для дослідження модифікації електронних властивостей кон'югатів наночастинок металів з антибіотиками використовували цефтріаксон.

Вивчали оптичні властивості як вказаного вище кон'югату, так і однієї з вихідних субстанцій для його синтезу — сферичних наночастинок нульвалентної міді розміром 20 нм, синтезованих за оригінальним протоколом методом хімічної конденсації у водному розчині в Інституті біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України. Для порівняння спектри оптичного поглинання визначали і для окремо виготовлених розчинів цефтріаксону та сульфату міді.

Спектральні властивості також вивчали для розчинів кон'югату з N-ацетилглюкозаміном (вуглеводним компонентом клітинної оболонки бактерій), фосфатидилхоліном (ліпідним компонентом), D-аланіном, D-глутаміновою кислотою, L-лізином, L-цистеїном (білковим компонентом). Кінцевий об'єм розчинів становив 10 мл. Концентрація субстанції кон'югату НЧМЦ становила 8,2 мг/мл, компонентів клітинної оболонки бактерій — 1,0 мг/мл.

Оптичні спектри зразків отримані з використанням приладу Perkin Elmer з аналізом у видимому діапазоні при кімнатній температурі. Аналіз експериментальних спектрів оптичного поглинання здійснювали за допомогою числових розкладів відповідних експериментальних контурів на елементарні складові відповідно до кількості мінімумів у спектрах другої похідної від даних контурів.

Для комп'ютерного моделювання структури молекули цефтріаксону використовували програмний пакет Gaussian-03, в якому напівемпіричним квантово-хімічним методом були проведені розрахунки перенесеного заряду та його розподілу на атомах молекули, а також електричного розміщення електронних станів поблизу щілини і сили осцилятора оптичних переходів.

На початковій стадії здійснена геометрична оптимізація, тобто виконана операція знаходження мінімумів на поверхні потенціальної енергії. Для цього застосовували метод Хартрі–Фока з використанням валентно-розщепленого базису 3-21G, що являє собою лінійні комбінації атомних функцій типу Гаусса. Методи ZINDO і AM1 використовували для встановлення спектрів УФ-видимого поглинання.

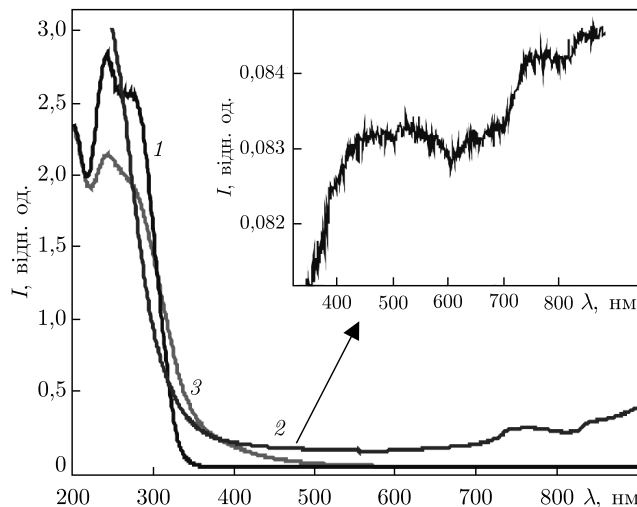


Рис. 1. Спектри поглинання цефтріаксону (1), наночастинок міді (2), кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном (3) в області 180–1200 нм (на вставці зображено спектр оптичного поглинання наночастинок міді в області 500–800 нм)

Результати та їх обговорення. Спектр оптичного поглинання цефтріаксону у водному розчині зосереджений в області 200–350 нм (рис. 1). Детальний аналіз за допомогою спектрального розкладу на компоненти дає можливість виділити два характерних піки при довжинах хвиль 240 та 277 нм, перший пік є найбільш інтенсивним.

Для пояснення природи піків поглинання проведено квантово-хімічні розрахунки геометрії та електронного стану молекули цефтріаксону. Геометрію молекули цефтріаксону наведено на рис. 2, а (див. вклейку). Видно, що будова молекули включає розгалужений насичений вуглеводневий ланцюг, що містить бензольне (фенільне) кільце з трьома атомами азоту, які заміщують атоми вуглецю. Атоми водню заміщені метильною групою CH_3 та двома атомами кисню. Загалом молекула цефтріаксону містить сім атомів кисню, що здатні до протонування при взаємодії з компонентами мембрани, три атоми сірки та вісім атомів азоту. Це призводить до нерівномірного розподілу заряду вздовж молекули (див. рис. 2, б) та виникнення дипольного моменту величиною 8,75 Д, що напрямлений у бік розгалуження вуглеводневого ланцюга.

На рис. 2, в наведено схему енергетичних рівнів і диполь-дипольних дозволених оптичних переходів в околі щілини HOMO–LUMO.

Видно, що потенціал іонізації молекули, який відповідає за передачу електронів іншим сполукам і дорівнює енергії HOMO, становить $-9,12$ еВ. Енергія спорідненості, що відповідає за приєднання молекулою цефтріаксону зовнішніх електронів, становить $-1,17$ еВ.

HOMO локалізована на бензольному кільці, яке містить атоми сірки та азоту, і належить до π -типу. LUMO є делокалізованою по всій молекулі і має змішаний характер. LUMO-1 локалізована на бензольному кільці.

Найбільш інтенсивним переходом, як свідчать результати визначення величини сили осцилятора, є перехід HOMO–LUMO+1. Він може бути найбільш чутливим до міжмолекулярної взаємодії.

Перехід з довжиною хвилі 460 нм з енергетичного рівня HOMO–2 на LUMO є переходом $\pi \rightarrow \pi^*$ типу, перехід з довжиною хвилі 367 нм з енергетичного рівня HOMO–3 на LUMO

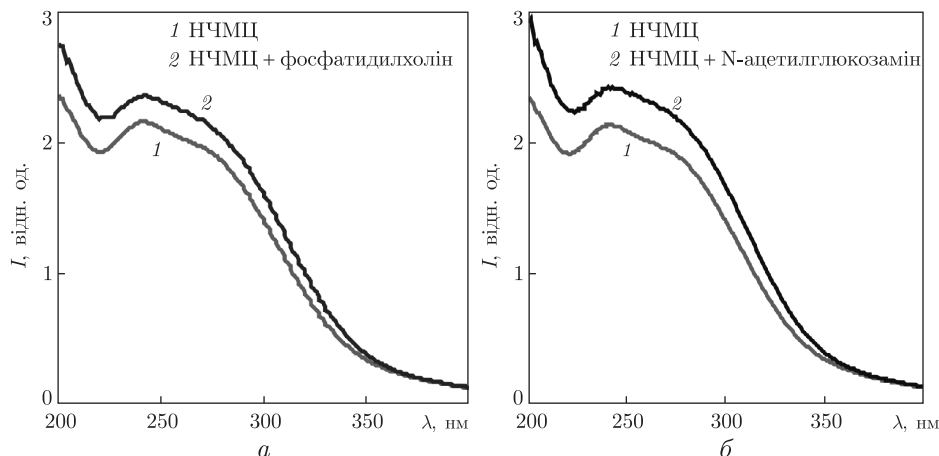


Рис. 4. Спектри поглинання розчину кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном та його розчину з фосфатидилхоліном (а) і з N-ацетилглюкозаміном (б)

є переходом $\pi \rightarrow \pi^*$ типу, перехід з довжиною хвилі 342 нм з енергетичного рівня НОМО на LUMO+1 є переходом $\pi \rightarrow \pi^*$ типу (табл. 1).

Спектр оптичного поглинання кон'югату НЧМЦ у водному розчині описується широкою смугою поглинання в області 200–350 нм. Детальний аналіз за допомогою спектрального розкладу на компоненти дає змогу виділити два характерних піки при довжинах хвиль 243 та 279 нм. Слід зазначити, що перший пік є найбільш інтенсивним.

Спектри кон'югату НЧМЦ не є результатом адитивного накладання спектрів його складових (див. рис. 1), що свідчить про утворення молекулярної сполуки.

В спектрі оптичного поглинання наночастинок міді (див. рис. 1 (вставка)) має місце малоінтенсивна смуга поглинання при довжині хвилі 500 нм, яка відповідає поверхневому плазмонному резонансу, що характерний для наночастинок міді. Вона слабо інтенсивна за рахунок того, що наночастинок міді з часом окиснюються.

Розглянемо взаємодію кон'югату НЧМЦ з білковим компонентом клітинної оболонки бактерій. На одержаних спектрах (рис. 3, див. вклейку) спостерігається звуження та зміщення піків, а також зміна інтенсивності поглинання в зразках розчинів кон'югату НЧМЦ з компонентами клітинної оболонки бактерій.

На рис. 4 наведено спектри оптичного поглинання розчинів НЧМЦ з фосфатидихоліном та N-ацетилглюкозаміном. Аналіз за допомогою спектрального розкладу на компоненти для кон'югату НЧМЦ з фосфатидихоліном дає змогу виділити два характерних піки при довжині хвилі 247 та 282 нм (див. рис. 4, а). Для кон'югату НЧМЦ з N-ацетилглюкозаміном спостерігається два характерних піки при довжині хвилі 250 та 285 нм (див. рис. 4, б).

Отримані дані потребують подальшого більш детального вивчення.

Визначені характеристики інтенсивних смуг спектрів поглинання досліджуваних речо-

Таблиця 1. Електронні переходи в молекулі цефтріаксону

Перехід	λ , нм	Основна конфігурація	Тип переходу	Сила осцилятора f	E , eВ
$S_0 \rightarrow S_1$	350	НОМО–LUMO+1	$\pi \rightarrow \pi^*$	0,0007	2,69
$S_0 \rightarrow S_2$	356	НОМО–3–LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$	0,0004	3,37
$S_0 \rightarrow S_3$	450	НОМО–2–LUMO	$\pi \rightarrow \pi^*$	0,0009	3,62

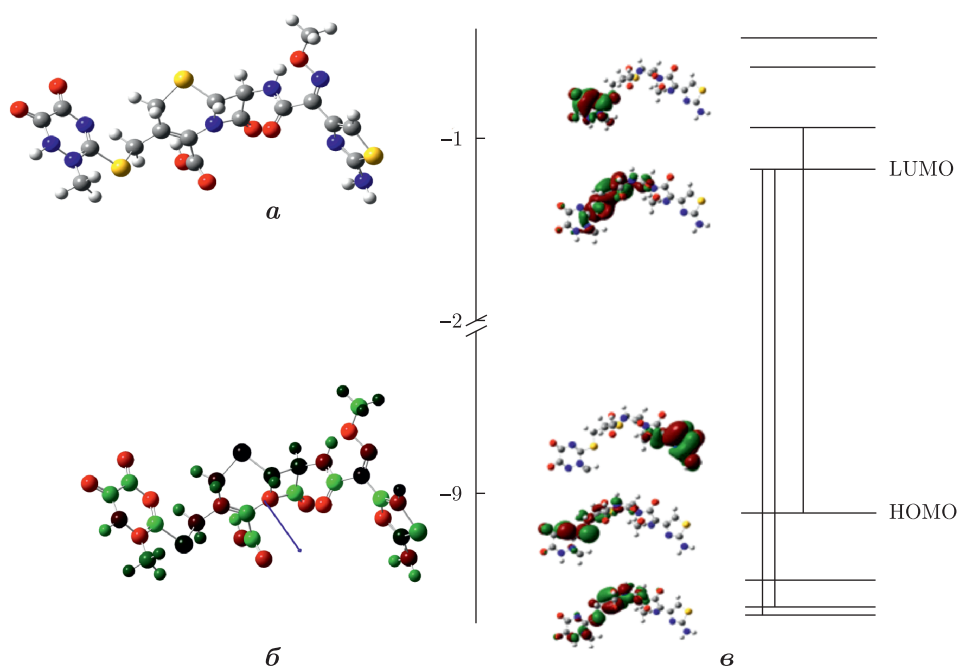


Рис. 2. Оптимізована геометрія молекули цефтріаксону (а) та розподіл заряду на ній (б) (стрілкою вказано величину та напрям дипольного моменту). Схема енергетичних рівнів молекули цефтріаксону (в) та енергетичні переходи, які можуть відбуватися в даній молекулі

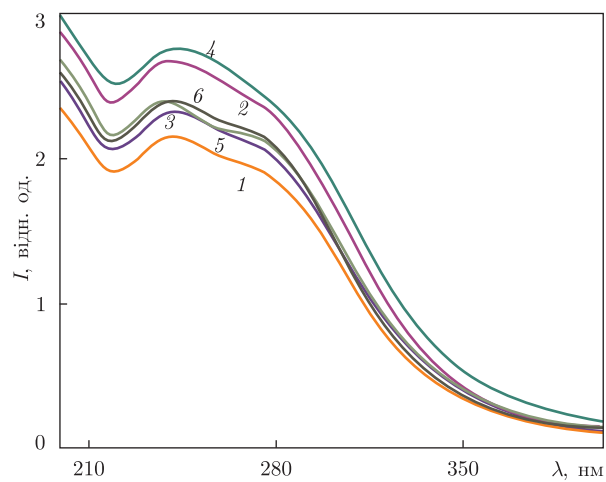


Рис. 3. Спектри поглинання розчину кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном (1) та його розчинів з аланіном (2), гліцином (3), глутаміною кислотою (4), цистеїном (5), лізином (6)

Таблиця 2. Положення максимумів інтенсивних смуг спектрів оптичного поглинання для розглянутих речовин

Параметр	ЦЕФ	НЧМЦ	АЛА + +НЧМЦ	ГЛІ + +НЧМЦ	ГЛУ + +НЧМЦ	ЛІЗ + +НЧМЦ	ЦИС + +НЧМЦ	АГА + +НЧМЦ	ФХ + +НЧМЦ
Положення максимумів, нм	240	243	245	245	245	243	241	247	250
Напівширина максимумів, нм	277	279	279	279	282	280	277	282	285
Напівширина максимумів, нм	25	27	25	27	29	27	24	27	32
максимумів, нм	49	61	45	42	64	62	42	52	43

вин зведено в табл. 2. Аналіз даних таблиці свідчить про наявність взаємодії кон'югату НЧМЦ з глютаміновою кислотою, що є білковим компонентом клітинної оболонки бактерій, фосфатидихоліном — ліпідним компонентом та N-ацетилглюкозаміном — вуглеводним компонентом, яка проявляється у зміщеннях положення максимумів оптичних переходів і зміні напівширини.

На підставі результатів дослідження можна зробити такі висновки.

Перший 0–0' перехід у спектрі поглинання цефтріаксону визначається основною конфігурацією НОМО → LUMO+1, що є орбіталями π-типу, локалізованими на бензольних кільцях. Другий перехід обумовлений основною конфігурацією НОМО–3 → LUMO, що належить до орбіталей π-типу, локалізованих на насиченому вуглецевому ланцюзі молекули цефтріаксону.

У спектрі поглинання наночастинок міді має місце малоінтенсивна смуга поглинання при довжині хвилі 500 нм, яка відповідає поверхневому плазмонному резонансу, що характерний для наночастинок міді.

Сpektри поглинання кон'югату НЧМЦ та чистого цефтріаксону не є адитивними, що свідчить про взаємодію його компонентів.

Наслідком взаємодії між наночастинами міді та молекулами цефтріаксону в кон'югаті є підсилення дії антибіотика на білковий, ліпідний, вуглеводний компоненти клітинної оболонки бактерій, яка проявляється в перебудові електронних станів бактерицидного засобу, що призводить до змін у положеннях і напівширині смуг дипольно дозволених оптичних переходів.

Цитована література

1. Jindal A. K., Pandya K., Khan I. D. Antimicrobial resistance: a public health challenge // Med. J. Armed Forces India. – 2015. – **71**, No 2. – P. 178–181.
2. Fair R. J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century // Perspect. Medicin. Chem. – 2014. – **6**. – P. 25–64.
3. Bijie H., Kulpradist S., Manalaysay M., Soebandrio A. In vitro activity, pharmacokinetics, clinical efficacy, safety and pharmacoeconomics of ceftriaxone compared with third and fourth generation cephalosporins: review // J. Chemother. – 2005. – **17**, No 1. – P. 3–24.
4. Duncan C. J., Barr D. A., Seaton R. A. Outpatient parenteral antimicrobial therapy with ceftriaxone, a review // Int. J. Clin. Pharm. – 2012. – **34**, No 3. – P. 410–417.
5. Esposito S., Noviello S., Vanasia A., Venturino P. Ceftriaxone versus other antibiotics for surgical prophylaxis: a meta-analysis // Clin. Drug Invest. – 2004. – **24**, No 1. – P. 29–39.
6. Lamb H. M., Ormrod D., Scott L. J., Figgitt D. P. Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections // Drugs. – 2002. – **62**, No 7. – P. 1041–1089.
7. Чекман І. С., Ульберг З. Р., Маланчук В. О., Горчакова Н. О., Зупанець І. А., Шаторна В. Ф., Білоус С. Б., Грузіна Т. Г., Дибкова С. М., Нагорна О. О., Небесна Т. Ю., Полова Ж. М., Резніченко Л. С., Савенкова О. О., Дорошенко А. М., Прискожа А. О., Рибачук А. В., Савченко Д. С., Сімонов П. В., Нагорна Т. І. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація. – Київ: Поліграф плюс, 2012. – 327 с.

8. *Singh R., Smitha M. S., Singh S. P.* The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2014. – **14**, No 7. – P. 4745–4756.
9. *Fayaz A. M., Girilal M., Mahdy S. A., Somsundar S. S., Venkatesan R., Kalaichelvan P. T.* Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: a different perspective for development of anti VRSA agents // *Process Biochem.* – 2011. – **46**, No 3. – P. 636–641.
10. *Shah M. R., Ali S., Ateeq M., Perveen S., Ahmed S., Bertino M. F., Ali M.* Morphological analysis of the antimicrobial action of silver and gold nanoparticles stabilized with ceftriaxone on *Escherichia coli* using atomic force microscopy // *New J. Chem.* – 2014. – **38**, No 11. – P. 5633–5640.
11. *Ingle A. P., Duran N., Rai M.* Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – **98**, No 3. – P. 1001–1009.
12. *Дибкова С. М.* Метод ДНК-комет в оцінці безпечності наночастинок металів біотехнологічного та медичного призначення // *Вісн. проблем біології і медицини.* – 2014. – **3**, вип. 3. – С. 279–283.
13. *Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B., Wan L.* Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo // *Toxicol. Lett.* – 2006. – **163**, No 2. – P. 109–120.
14. *Studer A. M., Limbach L. K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E. K., Gerber L. C., Moch H., Stark W. J.* Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles // *Toxicol. Lett.* – 2010. – **197**, No 3. – P. 169–174.

References

1. *Jindal A. K., Pandya K., Khan I. D.* *Med. J. Armed Forces India*, 2015, **71**, No 2: 178–181.
2. *Fair R. J., Tor Y.* *Perspect. Medicin. Chem.*, 2014, **6**: 25–64.
3. *Bijie H., Kulpradist S., Manalaysay M., Soebandrio A.* *J. Chemother.*, 2005, **17**, No 1: 3–24.
4. *Duncan C. J., Barr D. A., Seaton R. A.* *Intern. J. Clin. Pharm.*, 2012, **34**, No 3: 410–417.
5. *Esposito S., Noviello S., Vanasia A., Venturino P.* *Clin. Drug Invest.*, 2004, **24**, No 1: 29–39.
6. *Lamb H. M., Ormrod D., Scott L. J., Figgitt D. P.* *Drugs*, 2002, **62**, No 7: 1041–1089.
7. *Chekman I. S., Ulberg Z. R., Malanchuk V. O., Gorchakova N. O., Zupanets I. A., Shatorna V. F., Bilous S. B., Hruzina T. G., Dybkova S. M., Nahorna O. O., Nebesna T. Yu., Polova Zh. M., Reznichenko L. S., Savenkova O. O., Doroshenko A. M., Pryskoka A. O., Rybachuk A. V., Savchenko D. S., Simonov P. V., Nahorna T. I.* *Nanoscience, nanobiology, nanopharmacy*, Kiev: Poligraf plus, 2012 (in Ukrainian).
8. *Singh R., Smitha M. S., Singh S. P.* *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2014, **14**, No 7: 4745–4756.
9. *Fayaz A. M., Girilal M., Mahdy S. A., Somsundar S. S., Venkatesan R., Kalaichelvan P. T.* *Process Biochem.*, 2011, **46**, No 3: 636–641.
10. *Shah M. R., Ali S., Ateeq M., Perveen S., Ahmed S., Bertino M. F., Ali M.* *New J. Chem.*, 2014, **38**, No 11: 5633–5640.
11. *Ingle A. P., Duran N., Rai M.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, **98**, No 3: 1001–1009.
12. *Dybkova S. M.* *Herald of biological and medical problems*, 2014, **3**, Iss. 3: 279–283 (in Ukrainian).
13. *Chen Z., Meng H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B., Wan L.* *Toxicol. Lett.*, 2006, **163**, No 2: 109–120.
14. *Studer A. M., Limbach L. K., Van Duc L., Krumeich F., Athanassiou E. K., Gerber L. C., Moch H., Stark W. J.* *Toxicol. Lett.*, 2010, **197**, No 3: 169–174.

Надійшло до редакції 23.10.2015

П. В. Симонов¹, Д. О. Ковалева², Т. О. Буско², О. П. Дмитренко²,
член-корреспондент НАН Украины Н. П. Кулиш², М. А. Заболотный²,
М. О. Кузьменко², член-корреспондент НАН Украины И. С. Чекман¹

¹Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев

²Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

E-mail: chekman_ivan@yahoo.co.uk

Взаимодействие конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном с белковым, липидным и углеводным компонентами клеточной оболочки бактерий

Методами квантово-химических расчетов и оптической спектроскопии исследована возможность реализации взаимодействия конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном с белковым, липидным и углеводным компонентами клеточной оболочки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Показано, что в растворах конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном с рассмотренными веществами изменяется положение и полуширина дипольно разрешенных полос оптического поглощения, что указывает на перестройку электронных состояний цефтриаксона, обусловленную усилением его взаимодействия с компонентами клеточной оболочки бактерий за счет наличия наночастиц металла.

Ключевые слова: цефтриаксон, наночастицы меди, конъюгат, компонент клеточной оболочки бактерий.

P. V. Simonov¹, D. O. Kovalyova², T. O. Busko², O. P. Dmytrenko²,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. P. Kulysh², M. A. Zabolotnyy²,
M. O. Kuzmenko², Corresponding Member of the NAS of Ukraine I. S. Chekman¹

¹Bogomolets National Medical University, Kiev

²Taras Shevchenko National University of Kiev

E-mail: chekman_ivan@yahoo.co.uk

An interaction of the copper nanoparticles-ceftriaxone conjugate with protein, lipid, and carbohydrate components of bacterial cell envelope

A possibility of an interaction of the copper nanoparticles-ceftriaxone conjugate with protein, lipid, and hydrocarbon components of a cell envelope of gram-positive and gram-negative bacteria is studied by the means of quantum-chemical calculations and the optical spectroscopy. It is found out that the positions and half-widths of dipole-allowed optical absorption bands in solutions of the copper nanoparticles-ceftriaxone conjugate with the aforementioned substances are changed. It is shown that the ceftriaxone electronic state is changed because of the intensification of its interaction with components of a cell envelope due to the presence of metal nanoparticles.

Keywords: ceftriaxone, copper nanoparticles, conjugate, bacterial cell envelope component.