



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 3. С. 228–238

*Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 3, pp. 228–238

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-3-228-238>, EDN: LCGACH

Научная статья

УДК 57.089:66.017:665.939.17:577.359



## Инкапсуляция в эмульсионные микрогели: высокотехнологичная стратегия рационального применения антибактериальных препаратов

В. О. Пластун, М. С. Савельева, О. И. Гусякова, М. Е. Лобанов, О. А. Майорова<sup>✉</sup>

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Пластун Валентина Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», [voplastun@gmail.com](mailto:voplastun@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-6235-490X>, AuthorID: 954939

Савельева Мария Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», [mssaveleva@yandex.ru](mailto:mssaveleva@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-2021-0462>, AuthorID: 938218

Гусякова Ольга Игоревна, старший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», [olga.gusliakova17@gmail.com](mailto:olga.gusliakova17@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>, AuthorID: 1051902

Лобанов Михаил Евгеньевич, лаборант-исследователь лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», [Mishalobanov2016@bk.ru](mailto:Mishalobanov2016@bk.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1388-1842>, AuthorID: 1118999

Майорова Оксана Александровна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», [oksanaamayorova@gmail.com](mailto:oksanaamayorova@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>, AuthorID: 1001358

**Аннотация.** В исследовании были синтезированы эмульсионные микрогели (ЭМ) методом ультразвуковой гомогенизации на основе изолята сывороточного белка (ИСБ), содержащие антибактериальные препараты (АБ) (цефазолин (ЦЗ), цефтриаксон (ЦТ)). В основе метода получения ЭМ лежит денатурация ИСБ при ультразвуковом воздействии на раствор биомолекул с последующим образованием микрогелевой оболочки на поверхности капель масла. Изучены физико-химические свойства ЭМ в зависимости от их состава (дзета-потенциал частиц ЭМ, профили высвобождения АБ из частиц ЭМ), а также антимикробная активность ЭМ. Было показано, что количество высвобожденного АБ из синтезированных носителей в первые сутки эксперимента составляет 10% во всех исследованных модельных системах. Суммарное количество высвобожденного АБ за 144 ч достигает 20% в физиологическом растворе и 30% в искусственной моче. Все образцы ЭМ, содержащие ЦЗ, вызывали угнетение роста *E. coli* в течение 7 суток. Свободный ЦЗ сохранял активность на протяжении первых суток. Микрогели, содержащие ЦТ, продемонстрировали антибактериальный эффект на протяжении 14 суток. Продолжительность периода полного подавления роста у всех контрольных растворов АБ была существенно меньше по сравнению с образцами ЭМ. Таким образом, показано, что иммобилизация АБ (ЦЗ, ЦТ) в ЭМ методом ультразвуковой гомогенизации не влияет на их терапевтическую эффективность и позволяет существенно увеличить продолжительность и интенсивность антибактериального действия этих препаратов на культуре *E. coli*.

**Ключевые слова:** антибактериальные препараты, цефалоспорины, эмульсионные микрогели, изолят сывороточного белка

**Благодарности:** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10042, <https://rscf.ru/project/21-75-10042/>).

**Для цитирования:** Пластун В. О., Савельева М. С., Гусякова О. И., Лобанов М. Е., Майорова О. А. Инкапсуляция в эмульсионные микрогели: высокотехнологичная стратегия рационального применения антибактериальных препаратов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 3. С. 228–238. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-3-228-238>, EDN: LCGACH

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

**Encapsulation in emulsion microgels: A high-tech strategy for the rational use of antibiotics**

V. O. Plastun, M. S. Saveleva, O. I. Gusliakova, M. E. Lobanov, O. A. Mayorova<sup>✉</sup>

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov, 410012, Russia

Valentina O. Plastun, [voplastun@gmail.com](mailto:voplastun@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-6235-490X>

Mariia S. Saveleva, [mssaveleva@yandex.ru](mailto:mssaveleva@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-2021-0462>

Olga I. Gusliakova, [olga.gusliakova17@gmail.com](mailto:olga.gusliakova17@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>

Mikhail E. Lobanov, [Mishalobanov2016@bk.ru](mailto:Mishalobanov2016@bk.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1388-1842>

Oksana A. Mayorova, [oksanaamayorova@gmail.com](mailto:oksanaamayorova@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>

© Пластун В. О., Савельева М. С., Гусякова О. И., Лобанов М. Е., Майорова О. А., 2024



**Abstract. Background and Objectives:** The search of new effective antibacterial drugs and the development of more advanced dosage and delivery systems for existing antibiotics (AB) are actual research objectives for biomedical science. During the study emulsion microgels (EM), based on whey protein isolate, containing antibacterial drugs (cefazolin (CZ), ceftriaxone (CT)) were obtained by ultrasonic homogenization method. The effect of AB-loaded EM on *E. coli* strain was studied in comparison to free AB. **Materials and Methods:** The formation of oil-in-water microemulsions stabilized by whey protein isolate (WPI) in saline was carried out using the method of spontaneous emulsification during ultrasonic homogenization using a rod ultrasonic homogenizer. This approach is based on the denaturation of protein under ultrasonic influence on a solution of biomolecules with the subsequent formation of a microgel shell on the surface of oil droplets. Quantitative characteristics of antibiotics loading and its release from microgels were determined spectrophotometrically. Visualization and calculation of EMs particle sizes were carried out using an optical microscope. The study of AB-loaded EM antibacterial action was performed in liquid nutrient media followed by seeding onto nutrient agar. The experiment was followed with live-dead test, carried out by flow cytometry with cell visualization. **Results:** The rate and characteristics of AB release from the obtained carriers in various model media, as well as the antimicrobial activity of microgels, have been studied. It has been found that the release of AB from synthesized carriers on the first day of the experiment is 10% in all studied model systems. The total amount of AB released over 144 hours reaches 20% in saline solution and 30% in artificial urine. According to the results of the experiment, all samples of EM, containing CZ caused inhibition of *E. coli* growth within 7 days. Of these, total suppression of bacterial growth was observed within 1 day for EM 1 : 3 and 1 days for EM 1 : 5, on the remaining days – partial growth suppression. Free CZ remained active during the first day. EM, containing CT, demonstrated an antibacterial effect for 14 days. In this case, the bactericidal nature of the action was observed within 10 days for EM 1 : 3 and 13 days for EM 1 : 5. Free CT also had an antimicrobial effect for 14 days, but the duration of the period of complete growth inhibition in all control samples was significantly shorter compared to EM samples. **Conclusion:** The immobilization of antibacterial drugs (CZ, CT) into emulsion microgels not only does not lead to a decrease in their effectiveness, but also makes it possible to significantly increase the duration and intensity of action of these drugs. The results obtained are of interest for further study of the possibilities of using emulsion MGs based on WMB as carriers of antibacterial drugs.

**Keywords:** antibiotics, cephalosporins, emulsion microgels, whey protein isolate

**Acknowledgments:** The study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10042, <https://rscf.ru/project/21-75-10042/>).

**For citation:** Plastun V. O., Saveleva M. S., Gusliakova O. I., Lobanov M. E., Mayorova O. A. Encapsulation in emulsion microgels: A high-tech strategy for the rational use of antibiotics. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 3, pp. 228–238 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-3-228-238>, EDN: LCGACH

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

## Введение

Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам (АБ) является одной из серьезнейших проблем современной медицины [1–6]. На сегодняшний день в амбулаторной практике лечения заболеваний мочевыделительной системы широко применяются антибактериальные препараты (АБ) фторхинолонового ряда: офлоксацин (2-е поколение), ципрофлоксацин (2-е поколение) и левофлоксацин (3-е поколение), однако к настоящему времени уровень резистентности бактериальной популяции уропатогенных микроорганизмов к антибиотикам этой группы уже достаточно высок. Для примера, процент резистентности к ципрофлоксацину составляет до 82–86% [7], к левофлоксацину – 93% [8]. В то же время накоплен положительный опыт применения препаратов цефалоспоринового ряда [9, 10]. В число цефалоспоринов, к которым пока не произошло развитие высокой бактериальной резистентности, а также наиболее доступных и представленных на фармацевтическом рынке, входят цефазолин (2-е поколение) и цефтриаксон (3-е поколение) [9, 11].

Среди путей преодоления проблемы лекарственной устойчивости можно выделить как поиск новых соединений с антибактериальными

свойствами, так и разработку новых носителей для повышения эффективности уже существующих препаратов [5, 12–14]. В связи с этим большой интерес исследователей вызывают эмульсионные микрогели (ЭМ) – материал, совмещающий в себе свойства коллоидного раствора и гидрогеля [12, 13, 15, 16]. Благодаря особенностям строения и разнообразию веществ, формирующих микрогелевые частицы, они могут являться носителями лекарственных препаратов, а также самостоятельно проявлять антимикробные свойства [12, 14, 17, 18].

Эмульсионные микрогели (ЭМ) на основе изолята сывороточного белка зарекомендовали себя как нетоксичный, биосовместимый материал [19]. За счет наличия гидрофобного масляного ядра, стабилизированного амфифильными молекулами изолята сывороточного белка (ИСБ), становится возможным инкапсуляция как водорастворимых препаратов, что делает данные системы универсальными носителями лекарственных средств. Использование ИСБ как дешевого прекурсора более предпочтительно, чем аналогичные системы, стабилизированные более дорогими ПАВ.

В данном исследовании были разработаны ЭМ, которые способны иммобилизовать в сво-



ей гидрофильной оболочке антибактериальные препараты – ЦЗ и ЦТ, и могут быть потенциально использованы для терапии заболеваний мочевыделительной системы. Было показано пролонгированное высвобождение АБ из микрогелей в модельных средах – физиологическом растворе и искусственной моче. Изучено антимикробное действие полученных носителей на тестовый бактериальный штамм *Escherichia coli*.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Получение и изучение основных характеристик антибактериальных эмульсионных микрогелей на основе ИСБ

Для получения микроразмерных носителей, обладающих антибактериальным эффектом, был разработан протокол иммобилизации АБ (цефазолин (ЦЗ) (ЗАО «ЛЕККО», Россия) и цефтриаксон (ЦТ) (ОАО «Синтез», Россия)) в эмульсионные микрогели. Антибактериальные ЭМ были получены согласно протоколу, разработанному в работе [19], с небольшими изменениями, а именно: формирование микроэмульсий «масло-в-воде», стабилизированных ИСБ в 0.9% NaCl, было проведено с помощью метода самопроизвольного эмульгирования при ультразвуковой гомогенизации с использованием стержневого ультразвукового гомогенизатора Vandelin Sonopuls HD 2070 (Германия) при частоте 20 кГц и плотности мощности 1 Вт/см<sup>2</sup>. АБ добавляли в раствор ИСБ в концентрации 50 ЭМ/мл непосредственно перед ультразвуковым воздействием. Были получены ЭМ с оптимальным соотношением фаз вода : масло – 1 : 3, 1 : 5 (раствор ИСБ : масло (мас. : мас.)) и содержанием белка ИСБ, необходимого для стабилизации масляной фазы - 5% (мас. %).

Визуализация и расчет размеров частиц ЭМ были проведены с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Япония) с объективом 40×. Для расчета среднего размера капель эмульсии анализировали не менее 100 измерений и десять изображений для каждого образца. Свободно распространяемое программное обеспечение Image J было использовано для обработки изображений и статистики [20]. Средний размер капель был представлен как среднее значение ± стандартное отклонение.

Проводимость и ζ-потенциал капель в эмульсионных микрогелях оценивали с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Ins. Ltd,

Великобритания) на основе приближения Смолуховского.

Скорость высвобождения АБ из ЭМ была изучена *in vitro* в физиологическом растворе и искусственной моче. Длительность исследования составила 144 ч (6 дней). К 1 мл образца добавляли 1 мл модельной среды, после чего образцы были размещены в термошейкере Drybath (Thermo Scientific, США) и инкубированы при температуре 37°C при непрерывном встряхивании на скорости 700 об./мин. Спектры поглощения полученных растворов анализировали в диапазоне 200–1000 нм с помощью микропланшета CLARIO Star Plus (BMG Labtech, Германия) и 96-луночного микропланшета Costar® для определения иммобилизованного и высвободившегося количества АБ. Максимумы поглощения для ЦЗ и ЦТ были зарегистрированы при 274 и 242 нм соответственно. Количество ЦЗ и ЦТ в растворах определяли с использованием соответствующих калибровочных прямых для растворов АБ с известными концентрациями, рассчитанных по результатам измерения оптической плотности.

Иммобилизацию АБ в эмульсиях оценивали путем анализа растворов, полученных после фильтрации эмульсии в ячейке Amicon объемом 50 мл (Merck Millipore, Germany). Концентрацию АБ в растворах определяли спектрофотометрически.

Загрузочная способность (LC) в эмульсиях была рассчитана согласно следующей формуле:

$$LC(\%) = \frac{M_{\text{initial}} - M_{\text{solutions}}}{M_{\text{initial}}} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $M_{\text{initial}}$  – количество препаратов в исходных растворах, использованных при приготовлении эмульсий;  $M_{\text{solutions}}$  – общее количество препаратов в растворах, полученных после фильтрации эмульсий.

### 2.2. Изучение антимикробной активности

Изучение возможности пролонгированного антибактериального действия полученных микроносителей было проведено на тестовом штамме *Escherichia coli*. Для эксперимента были взяты образцы ЭМ, полученные при разном соотношении вода : масло (1 : 3, 1 : 5) без антибиотика, а также содержащие ЦЗ или ЦТ. В качестве контроля были использованы растворы этих антибиотиков в свободной форме. Растворы каждого антибиотика были приготовлены в двух концентрациях (2 мг/мл и 20 мг/мл), соответствующих количеству препарата, выходящего из ЭМ



за первые 24 ч и общему количеству загруженно-го препарата соответственно. Также эксперимент сопровождался контрольным посевом *E. coli*.

Эксперимент выполнялся по приведенной ниже схеме.

1. В стерильные пробирки помещали питательный бульон Мюллера – Хинтона, содержащий *E. coli* ( $0.7 \cdot 10^7$  КОЕ/мл).

2. Добавляли в пробирки исследуемые образцы (50 мкл/1 мл среды).

3. Инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

4. Содержимое пробирок тщательно перемешивалось, из каждой пробирки отбирали 25% жидкости и заменяли на эквивалентный объем свежей среды, содержащей *E. coli*. ( $0.7 \times 10^7$  КОЕ/мл).

5. 0.5 мл культуральной жидкости из каждого образца высевалось на питательный агар для количественной оценки роста КОЕ.

6. Пробирки с образцами и чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 24 ч.

7. Проводили учет роста бактерий на питательном агаре.

Образцы, не проявившие антибактериальное действие, удаляли из эксперимента. Для образцов, показавших бактерицидный или бактериостатический эффект, повторяли пп. 4–7.

### 2.3. Визуализация выживаемости бактериальных клеток методом проточной цитометрии

Исследование бактериальных субпопуляций в образцах (живые и мертвые бактерии) было проведено методом проточной цитометрии с возможностью визуализации в потоке (Amnis® ImageStream®X Mk II) на 7-е и 13-е сутки проведения антибактериальных тестов разработанных ЭМ. Предварительно было проведено окрашивание бактериальных клеток с помощью DAPI и пропидий йодида. Стоковый раствор для окрашивания клеток был приготовлен следующим образом. В 1 мл физиологического раствора были добавлены 10 мкл водного раствора DAPI (5 мг/мл) и 10 мкл пропидий йодида (1 мг/мл). Из каждой пробирки было отобрано 1 мл культуральной жидкости. Бактериальные клетки были отделены от жидкой питательной среды с помощью центрифугирования (9000 об./мин, 5 мин) и промыты дважды физиологическим раствором. Каждый образец ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора, затем добавляли 50 мкл стокового раствора для окрашивания. Все образцы были закрыты фольгой от све-

та и оставлены на 15 минут при комнатной температуре. Исследование на цитометре было проведено после трехкратной отмывки красителя физиологическим раствором посредством центрифугирования.

В качестве положительного контроля выступали бактерии, фиксированные с помощью формалина (10%-ный раствор в PBS). Бактериальные клетки отмывали от питательной среды посредством двукратного центрифугирования в физиологическом растворе, суспендировали в 1 мл формалина и выдерживали в нем в течение 2 ч. После этого клетки снова центрифугировали и ресуспендировали в физиологическом растворе. В качестве отрицательного контроля были рассмотрены бактериальные клетки, которые не подвергались какому-либо воздействию.

В ходе данного исследования были использованы лазеры 405 нм (120 мВт) и 488 нм (200 мВт). Сигнал пропидий йодида регистрировали в 5-м канале (диапазон регистрации 642–745 нм при возбуждении лазером 488 нм), сигнал DAPI – в 7-м канале (диапазон регистрации 435–505 нм при возбуждении лазером 405 нм). На точечных диаграммах, показывающих интенсивности флуоресценции в каналах, характерных для пропидий йодида и DAPI, были определены области, представляющие субпопуляции живых и мертвых бактериальных клеток. Доля мертвых и живых клеток в популяции представлена в виде стековой столбчатой диаграммы. Так же были получены значения концентраций всех бактериальных клеток в исследуемом образце.

### 3. Результаты

Для получения ЭМ на основе изолята сывороточного белка, обладающих антимикробной активностью, был модифицирован ранее разработанный нами протокол, а именно были приготовлены микрогели с соотношением вода:масло 1:3 и 1:5, содержащие антибактериальные препараты цефазолин и цефтриаксон [19]. Изображения антибактериальных ЭМ, полученные с помощью оптической микроскопии, представлены на рис. 1, а, характеристики данных ЭМ (средний размер частиц ЭМ, зета-потенциал ЭМ и эффективность загрузки АБ в ЭМ) представлены на рис. 1, б–г. Была подсчитана средняя концентрация частиц ЭМ: ЦЗ 1:3 –  $2.3 \cdot 10^{10}$  шт. в 1 мл ЭМ, ЦЗ 1:5 –  $3.3 \cdot 10^{10}$  шт. в 1 мл ЭМ, ЦТ 1:3 –  $1.1 \cdot 10^{10}$  шт. в 1 мл ЭМ, ЦТ 1:5 –  $3.6 \cdot 10^{10}$  шт. в 1 мл ЭМ. Как видно на оптических



изображениях (см. рис. 1, а), увеличение объема масляной фазы (с 1 : 3 до 1 : 5) приводит к образованию большего числа микрокапель, которые стабилизируются нативными белками, входящими в состав ИСБ ( $\alpha$ -лактальбумин,  $\beta$ -лактоглобулин) в процессе ультразвуковой гомогенизации, что приводит к образованию большего числа частиц ЭМ, содержащих антибиотики. Согласно проведенному статистическому анализу (см. рис. 1, б), можно отметить, что размеры частиц, содержащих ЦЗ ( $2.5 \pm 0.3$  мкм и  $2.8 \pm 0.5$  мкм для соотношений 1 : 3 и 1 : 5, соответственно) и ЦТ ( $2.9 \pm 0.8$  мкм и  $3.2 \pm 0.6$  мкм для соотношений 1 : 3 и 1 : 5 соответственно) и полученных при

одинаковом соотношении вода : масло, коррелируют между собой ( $p < 0.05$ ).

Как известно, стабилизация эмульсионных капель молекулами ИСБ определяется величиной поверхностного заряда носителей (см. рис. 1, в). Наблюдается зависимость значений дзета-потенциала полученных антибактериальных микрогелей от их состава и соотношения вода : масло. Образцы, полученные при соотношении вода : масло 1 : 3 ( $-39.5 \pm 0.6$  мВ для образца ЦЗ 1 : 3 и  $-40.3 \pm 0.8$  мВ для образца ЦТ 1 : 3), обладают большим значением дзета-потенциала, чем эмульсии, полученные при соотношении вода : масло 1 : 5 ( $-48.9 \pm 0.2$  мВ для

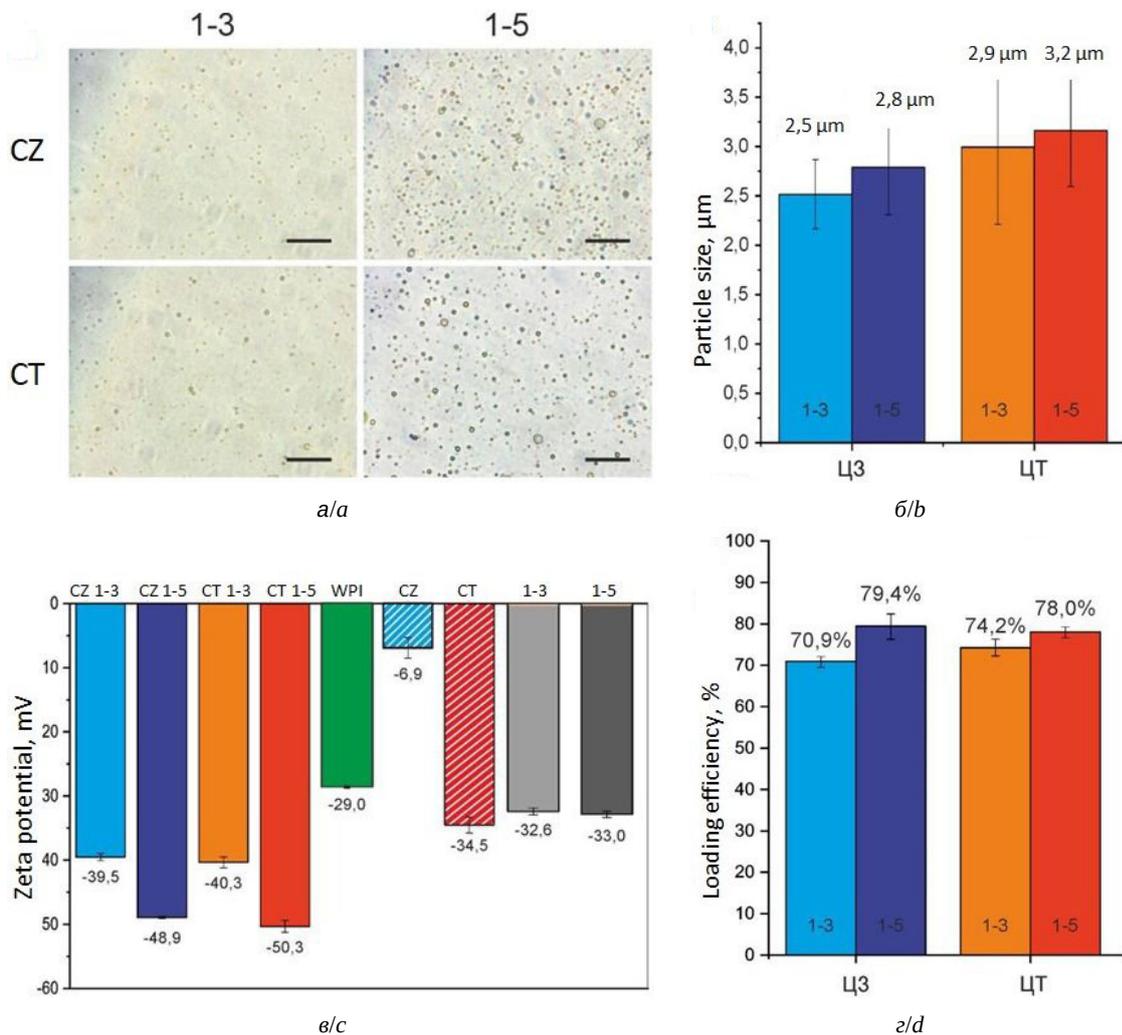


Рис. 1. Оптические изображения ЭМ, содержащих АБ, при различном соотношении вода : масло. Масштабный отрезок на изображениях соответствует 50 мкм (а). Средний размер частиц в ЭМ, содержащих АБ ЦЗ и ЦТ, полученных при соотношении вода : масло 1 : 3 и 1 : 5 (б). Дзета-потенциалы частиц данных ЭМ, а также исходных растворов ИСБ, ЦЗ и ЦТ (в). Эффективность загрузки ЦЗ и ЦТ в ЭМ (г) (цвет онлайн)

Fig. 1. Optical images of AB-containing EMs at different water : oil ratios. The scale bar in the images corresponds to 50  $\mu\text{m}$  (a). Average particle size in emulsion MGs containing AB CZ and CT, obtained at water : oil ratios of 1 : 3 and 1 : 5 (b). Zeta potentials of particles of these MGs, as well as the initial solutions of WPI, CZ, and CT (c). Loading efficiency of CZ and CT into EM (d) (color online)



образца ЦЗ 1:5 и  $-50.3 \pm 0.9$  мВ для образца ЦТ 1:5). Такое различие можно объяснить большим количеством масляных капель, стабилизированных нативными белками ИСБ и, как следствие, большей загрузочной емкостью носителей «инкапсулировать» вещества. Природа антибактериальных препаратов незначительно влияет на поверхностный заряд частиц. Однако прослеживается тенденция к увеличению абсолютного значения дзета-потенциала микрогелей от ЦЗ к ЦТ для одинаковых типов образцов, что, вероятно, обусловлено зарядом самих молекул антибиотиков.

Массу ЦЗ и ЦТ, иммобилизованных в ЭМ, была определена путем исследования супернатантов спектрофотометрическим методом.

На рис. 1, г представлены величины эффективности загрузки лекарственных средств в ЭМ с различным соотношением вода:масло (1:3; 1:5). Высокий процент загрузки ЦЗ и ЦТ от исходного количества, взятого для приготовления ИСБ-стабилизированных микрогелей, наблюдается для образцов, полученных при соотношении вода:масло 1:5 и составляет 79.4 и 78.0% соответственно.

Результаты расчетов массовой концентрации высвободившихся ЦЗ и ЦТ из ЭМ в течение времени в двух модельных средах – физиологическом растворе и искусственной моче – представлены на рис. 2, а–г.

Резкое высвобождение АБ наблюдается в первые 24 часа после начала инкубации и до-

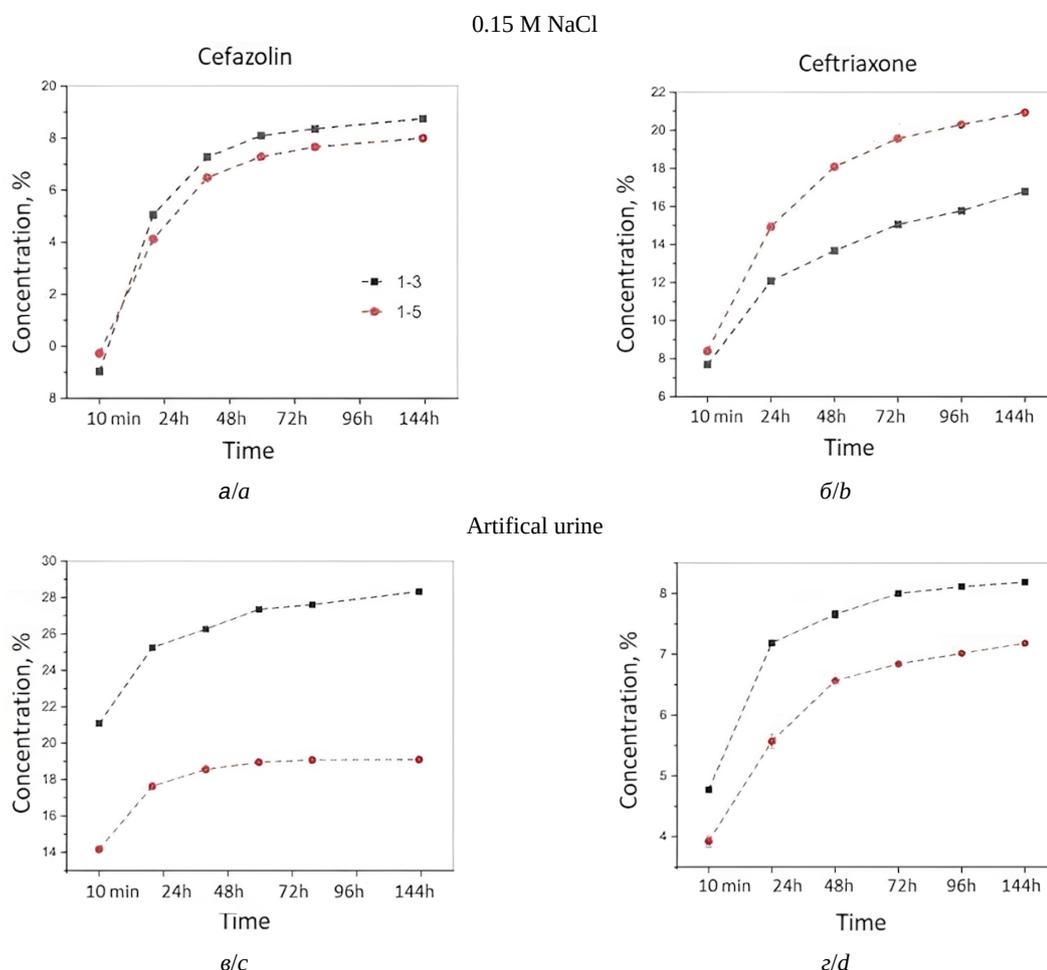


Рис. 2. Зависимость массовой концентрации вышедших АБ – ЦЗ (а), ЦТ (б) – из ЭМ, полученных при соотношении вода:масло ((1:3, 5%), (1:5, 5%)), от времени инкубации в физиологическом растворе (0.15M NaCl). Зависимость массовой концентрации вышедших АБ – ЦЗ (в), ЦТ (г) – из ЭМ, полученных при соотношении вода:масло ((1:3, 5%), (1:5, 5%)), от времени инкубации в растворе искусственной мочи (цвет онлайн)

Fig. 2. Mass concentration dependence of AB – CZ (a), CT (b) – from WPI emulsion microgels, obtained at different ratios of water:oil ((1:3, 5%), (1:5, 5%)), on the incubation time in physiological solution (0.15M NaCl). Mass concentration dependence of AB – CZ (c), CT (d) – from WPI emulsion microgels, obtained at different water:oil ratios ((1:3, 5%), (1:5, 5%)), on the incubation time in artificial urine solution (color online)



стигает 10% от загруженного количества. Во всех случаях высвобождение ЦЗ и ЦТ из ЭМ в физиологическом растворе не превышает 20% (рис. 2, а, б), в искусственной моче – 30 % (рис. 2, в, г). Вероятно, такая низкая степень высвобождения лекарств наблюдается за счет изменения конформации и химического строения АБ в процессе связывания их с ИСБ. Согласно литературным данным, связывание ЦЗ с белками плазмы составляет около 70%, а для ЦТ – 95% [21–23]. Стоит отметить, что в большинстве случаев для ЭМ с меньшим содержанием масла (1:3, 5%) количество АБ, высвободившихся в процессе инкубации, выше относительно исходно загруженного, чем для ЭМ с более высоким содержанием масла (1:5, 5%). Исключением является высвобождение ЦТ в физиологическом растворе. Процент высвободившегося из ЭМ (1:5, 5%) ЦТ выше, чем из ЭМ (1:3, 5%) в одинаковых условиях. Это связано с взаимодействием ЦТ с ИСБ и одновременной стабилизацией большего количества масла в процессе формирования ЭМ.

Было изучено антимикробное действие загруженных антибиотиками носителей на бульонную культуру *E. coli*. Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице.

Согласно результатам эксперимента, все образцы ЭМ, содержащие ЦЗ, вызвали угнетение роста *E. coli* в течение 7 суток, из них полное подавление роста бактерий наблюдалось в течение первых суток для ЭМ 1:3 и вторых суток для ЭМ 1:5.

Цефазолин в свободной форме вызывал частичное угнетение роста микроорганизмов в первые сутки эксперимента, спустя 2 суток действие препарата прекратилось. Полученные результаты согласуются с имеющимися данными об устойчивости ЦЗ в водном растворе. Известно, что раствор этого препарата при комнатной температуре устойчив в течение 24 ч, для более продолжительного хранения требуется соблюдение специальных условий: пониженная температура, ограничение контакта раствора с воздухом и др. [24].

ЭМ, содержащие ЦТ, продемонстрировали антибактериальный эффект на протяжении

#### Характер антибактериального действия ЦТ и ЦЗ, иммобилизованных в ЭМ, и в свободной форме

##### The type of the antibacterial action of CT and CT immobilized in MG and in free form

Day	Ceftriaxone				Cefazolin				Control		
	MG 1:3	MG 1:5	FA 20	FA 2	MG 1:3	MG 1:5	FA 20	FA 2	MG 1:3	MG 1:5	<i>E. coli</i>
1	–	–	–	–	–	–	+/-	+/-	+	+	+
2	–	–	–	–	+/-	–	+	+			
3	–	–	–	–	+/-	+/-					
4	–	–	–	–	+/-	+/-					
5	–	–	–	–	+/-	+/-					
6	–	–	–	+/-	+/-	+/-					
7	–	–	–	+/-	+/-	+/-					
8	–	–	–	+/-	+	+					
9	–	–	–	+/-							
10	–	–	+/-	+/-							
11	+/-	–	+/-	+/-							
12	+/-	–	+/-	+/-							
13	+/-	–	+/-	+/-							
14	+/-	+/-	+/-	+/-							
15	+	+	+	+							

Примечание. MG 1:3 – микрогели с соотношением водной и масляной фракции 1:3; MG 1:5 – микрогели с соотношением водной и масляной фракции 1:5; FA 20 – свободный антибиотик в концентрации 20 мг/мл; FA 2 – свободный антибиотик в концентрации 2 мг/мл. «+» – сплошной рост микроорганизмов на питательной среде (отсутствие антимикробного действия препарата); «+/-» – рост единичных бактериальных колоний (бактериостатический эффект препарата); «–» – отсутствие роста бактерий на питательной среде (бактерицидный эффект препарата).

Note. MG 1:3 are emulsion microgels with a ratio of water and oil fractions of 1:3; MG 1:5 are emulsion microgels with a ratio of water and oil fractions of 1:5; FA 20 is a free antibiotic at a concentration of 20 mg/ml; FA 2 is a free antibiotic at a concentration of 2 mg/ml. “+” denotes continuous growth of microorganisms on a nutrient medium (lack of antimicrobial effect of the drug); “+/-” denotes growth of single bacterial colonies (bacteriostatic effect of the drug); “–” denotes absence of bacterial growth on the nutrient medium (bactericidal effect of the drug).



14 дней. При этом бактерицидный характер действия наблюдался в течение 10 дней для ЭМ 1:3 и 13 дней для ЭМ 1:5. Свободный ЦТ также оказывал антимикробное действие в течение 14 дней, однако продолжительность периода полного подавления роста у всех образцов была существенно меньше по сравнению с образцами ЭМ (5 дней для свободного ЦТ в концентрации

2 мг/мл и 9 дней для свободного ЦТ в концентрации 20 мг/мл).

Для уточнения характера действия исследуемых препаратов на тестовый бактериальный штамм было проведено исследование субпопуляций в культуре методом проточной цитометрии с возможностью визуализации на 7-е и 13-е сутки

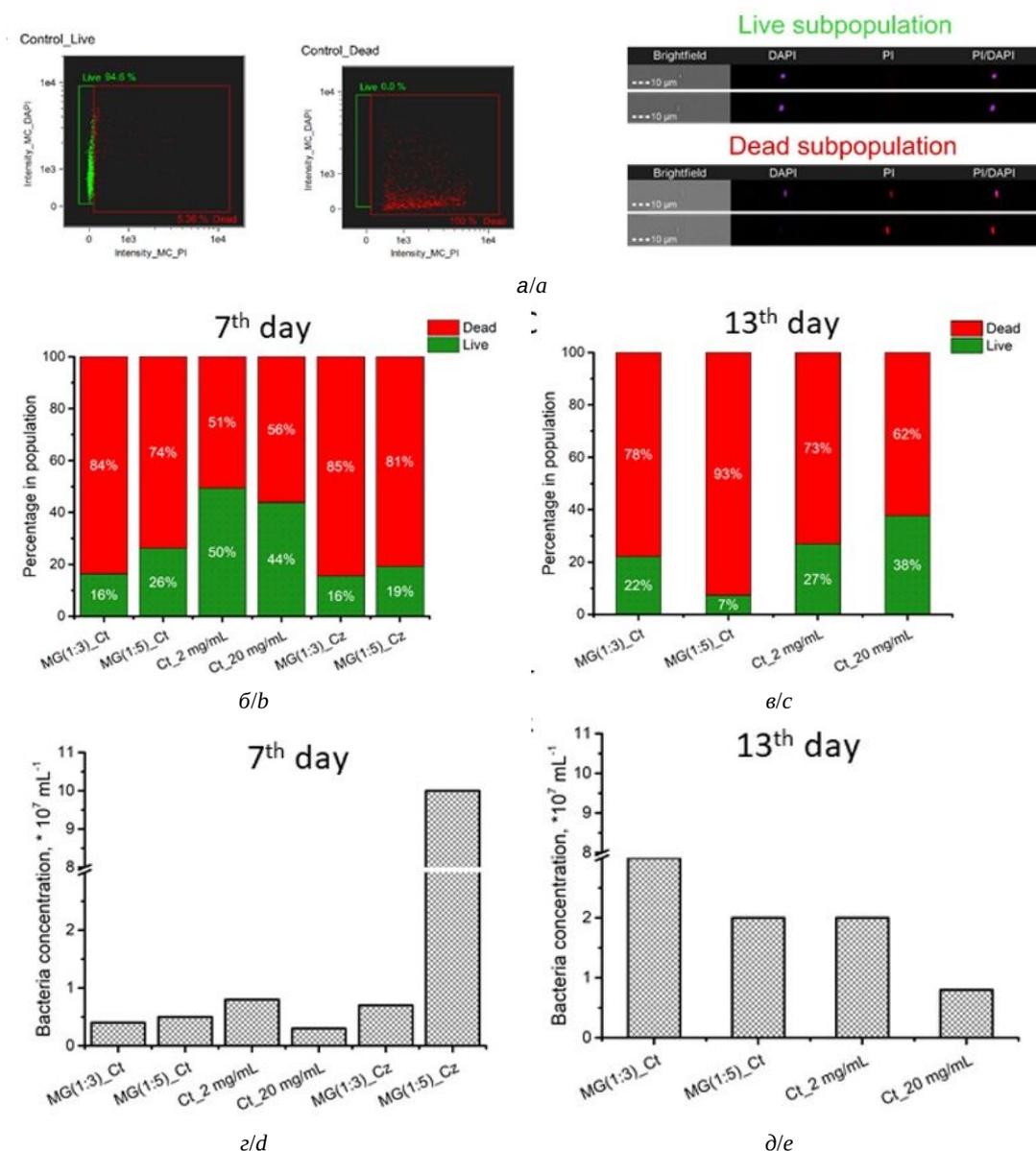


Рис. 3. Примеры точечных диаграмм, характеризующих интенсивность окрашивания бактериальных клеток флуоресцентными красителями DAPI и пропидий йодид, и визуализация клеток, определяемых в данном исследовании как «живые» и «мертвые» (а). Состав популяции бактериальной культуры после 7 (б) и 13 (в) дней со-инкубации с исследуемыми микрогелями, содержащими АБ, и свободным АБ. Концентрация бактериальных клеток после 7 (г) и 13 (д) дней со-инкубации с антибактериальными микрогелями и свободным АБ (цвет онлайн)

Fig. 3. Examples of dot plots characterizing the intensity of bacterial cells staining with the fluorescent dyes DAPI and Propidium iodide, and the visualization of cells defined as “live” and “dead” in this study (a). Subpopulations in the bacterial culture after 7 (b) and 13 (c) days of co-incubation with the designed microgels containing antibiotics and free antibiotics. Concentration of bacterial cells after 7 (d) and 13 (e) days of co-incubation with antibacterial microgels and free antibiotics (color online)



проведения антибактериальных тестов, разработанных ЭМ (рис. 3).

Наблюдение живых и мертвых субпопуляций бактериальных клеток после инкубирования с различными образцами показывает, что ЭМ, содержащие ЦТ, оказывают больший антибактериальный эффект по сравнению со свободным АБ (рис. 3, б и рис. 3, в). Так, процент живых бактериальных клеток в популяциях, инкубированных с ЭМ в течение 7 дней, не превышает 27%, в то время как в образцах, инкубированных с чистым АБ, доля живых клеток составляет примерно половину популяции. Однако стоит отметить, что с течением времени эффективность как антибиотико-содержащих ЭМ, так и свободных АБ снижается, что заметно по общей численности бактерий в исследуемой суспензии (рис. 3, г и рис. 3, д). Количество бактериальных клеток после 13 дней проведения эксперимента на порядок выше по сравнению с образцами, рассмотренными на 7-й день.

### Заключение

Установлено, что релиз АБ из синтезированных носителей в первые сутки эксперимента составляет 10% во всех исследованных модельных системах. Суммарное количество высвобожденного за 144 ч АБ достигает 20% в физиологическом растворе и 30% в искусственной моче. Иммунизация антибактериальных препаратов (ЦЗ, ЦТ) в ЭМ не только не приводит к снижению их эффективности, но и позволяет существенно увеличить продолжительность и интенсивность действия этих препаратов.

Полученные результаты представляют интерес для дальнейшего изучения возможностей применения ЭМ на основе ИСБ в качестве носителей антибактериальных препаратов.

### Список литературы

1. Larsson D. G. J., Flach C.-F. Antibiotic resistance in the environment // *Nat. Rev. Microbiol.* 2022. Vol. 20. P. 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
2. Frieri M., Kuma K., Boutin A. Antibiotic resistance // *J. Infect. Public Heal.* 2017. Vol. 10, № 4. P. 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
3. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Bazzaz B. S. F. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them // *Microb. Pathog.* 2016. Vol. 95. P. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
4. French G. L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. Vol. 57, № 10. P. 1514–1527. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.005>
5. Elder D. P., Kuentz M., Holm R. Antibiotic resistance: The need for a global strategy // *J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 105, № 8. P. 2278–2287. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.002>
6. Земляноко О. М., Рогоза Т. М., Журавлева Г. А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // *Экол. ген.* 2018. Т. 16, № 3. С. 4–17. <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>
7. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic // *Pol. J. Microbiol.* 2019. Vol. 68, № 4. P. 403–415. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-048>
8. Cao D., Shen Y., Huang Y., Liu L., Yang L., Wei Q. Levofloxacin versus ciprofloxacin in the treatment of urinary tract infections: Evidence-based analysis // *Front. Pharmacol.* 2021. Vol. 12. Article number 658095. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.658095>
9. Wang S. S., Ratliff P. D., Judd W. R. Retrospective review of ceftriaxone versus levofloxacin for treatment of *E. coli* urinary tract infections // *Int. J. Clin. Pharm.* 2018. Vol. 40. P. 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11096-017-0560-1>
10. Bunduki G. K., Heinz E., Phiri V. S., Noah P., Feasey N., Musaya J. Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis // *BMC Infect. Dis.* 2021. Vol. 21. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06435-7>
11. Jones R. N., Nguyen H. M. 1453. Cephalexin and Cefadroxil Are Not Therapeutic Equivalents for Uncomplicated Cystitis (uUTI): Further Analysis of Cefazolin Surrogate Susceptibility Testing Criteria // *Open Forum Infect. Diseases.* 2019, October. Vol. 6. P. S530–S531. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz360.1317>
12. Nordstöm R., Nystöm L., Ilyas H., Atraya H. S., Borro B. C., Bhunia A., Malmsten M. Microgels as carriers of antimicrobial peptides—effects of peptide PEGylation // *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* 2019. Vol. 565. P. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.049>
13. Xiao X., Ji J., Wang H., Nangia S., Wang H., Libera M. Self-Defensive Antimicrobial Surfaces Using Polymyxin-Loaded Poly (styrene sulfonate) Microgels // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2022. Vol. 8, № 11. P. 4827–4837. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00783>
14. Cheng H., Liu H., Shi Z., Xu Y., Lian Q., Zhong Q., Liu Q., Chen Y., Pan X., Chen R., Wang P. Long-term antibacterial and biofilm dispersion activity of an injectable in situ crosslinked co-delivery hydrogel/microgel for treatment of implant infection // *Chem. Eng. J.* 2022. Vol. 433. Article number 134451. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.134451>
15. Ma Q., Ma S., Liu J., Pei Y., Tang K., Qiu J., Wan J., Zheng X., Zhang J. Preparation and application of natural protein polymer-based Pickering emulsions // *E-Polym.* 2023. Vol. 23, № 1. Article number 20230001. <https://doi.org/10.1515/epoly-2023-0001>
16. Кузнецов В. А., Куцнев П. О., Останкова И. В., Пульвер А. Ю., Пульвер Н. А., Павлович С. В., Полтавцева П. А. Современные подходы к медицинскому использованию сополимерных рН-и температурно-



- чувствительных гидрогелей (обзор) // Конденсированные среды и межфазные границы. 2020. Вып. 22, № 4. С. 417–429. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2020.22/3113>
17. Zheng J., Zhu C., Xu X., Wang X., Fu J. Supramolecular assemblies of multifunctional microgels for biomedical applications // *J. Mater. Chem. B*. 2023. Vol. 11. P. 6265–6289. <https://doi.org/10.1039/D3TB00346A>
  18. Sahiner N. Amino acid-derived Poly (L–Lysine)(p (LL)) microgel as a versatile biomaterial: Hydrolytically degradable, drug carrying, chemically modifiable and antimicrobial material // *Polym. Adv. Technol.* 2020. Vol. 31, № 10. P. 2152–2160. <https://doi.org/10.1002/pat.4936>
  19. Saveleva M. S., Lobanov M. E., Gusliakova O. I., Plastun V. O., Prikhozhenko E. S., Sindeeva O. A., Gorin D. A., Mayorova O. A. Mucoadhesive emulsion microgels for intravesical drug delivery: Preparation, retention at urothelium, and biodistribution study // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2023. Vol. 15, № 21. P. 25354–25368. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
  20. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9. P. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
  21. Abu T. M. M., Ghithan J., Abu-Taha M. I., Darwish S. M., Abu-hadid M. M. Spectroscopic approach of the interaction study of ceftriaxone and human serum albumin // *J. Biophys. Struct. Biol.* 2014. Vol. 6. P. 1–12. <https://doi.org/10.1128/aac.01170-18>
  22. Watanabe Y., Hayashi T., Takada R., Yasuda T., Saikawa I., Shimizu K. Studies on protein binding of antibiotics. I. Effect of cefazolin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1980. Vol. 33. P. 625–635. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
  23. Shimizu T. Studies on protein binding of cefazolin and other antibiotics // *Jpn. J. Antibiot.* 1974. Vol. 27. P. 296–301. <https://doi.org/10.1128/aac.01170-18>
  24. Donnelly R. F. Stability of cefazolin sodium in polypropylene syringes and polyvinylchloride minibags // *Can. J. Hosp. Pharm.* 2011. Vol. 64, № 4. P. 241–245. <https://doi.org/10.4212/cjhp.v64i4.1035>
  - pp. 1514–1527. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.005>
  5. Elder D. P., Kuentz M., Holm R. Antibiotic Resistance: The Need For a Global Strategy. *J. Pharm. Sci.*, 2016, vol. 105, pp. 2278–2287. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.002>
  6. Zemlyanko O. M., Rogoza T. M., Zhouravleva G. A. Mechanisms of bacterial multiresistance to antibiotics. *Ecol. Genet.*, 2018, vol. 16, pp. 4–17. <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>
  7. Kot B. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic Escherichia coli. *Polish J. Microbiol.*, 2019, vol. 68, pp. 403–415. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-048>
  8. Cao D., Shen Y., Huang Y., Chen B., Chen Z., Ai J., Liu L., Yang L., Wei Q. Levofloxacin Versus Ciprofloxacin in the Treatment of Urinary Tract Infections: Evidence-Based Analysis. *Front. Pharmacol.*, 2021, vol. 12, article no. 658095. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.658095>
  9. Wang S. S., Ratliff P. D., Judd W. R. Retrospective review of ceftriaxone versus levofloxacin for treatment of E. coli urinary tract infections. *Int. J. Clin. Pharm.*, 2018, vol. 40, pp. 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11096-017-0560-1>
  10. Bunduki G. K., Heinz E., Phiri V. S., Noah P., Feasey N., Musaya J. Virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) isolated from urinary tract infections: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, 2021, vol. 21, pp. 753. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06435-7>
  11. Jones R. N., Nguyen H. M. 1453. Cephalexin and Cefadroxil Are Not Therapeutic Equivalents for Uncomplicated Cystitis (uUTI): Further Analysis of Cefazolin Surrogate Susceptibility Testing Criteria. *Open Forum Infection Diseases*, 2019, vol. 6, pp. S530–S531. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz360.1317>
  12. Nordstöm R., Nystöm L., Ilyas H., Atreya H. S., Borro B. C., Bhunia A., Malmsten M. Microgels as carriers of antimicrobial peptides – Effects of peptide PEGylation. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.*, 2019, vol. 565, pp. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.049>
  13. Xiao X., Ji J., Wang H., Nangia S., Wang H., Libera M. Self-Defensive Antimicrobial Surfaces Using Polymyxin-Loaded Poly(styrene sulfonate) Microgels. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2022, vol. 8, pp. 4827–4837. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00783>
  14. Cheng H., Liu H., Shi Z., Xu Y., Lian Q., Zhong Q., Liu Q., Chen Y., Pan X., Chen R., Wang P., Gao J., Gao C., Zhang Y., Yue K., Wang J., Shi Z. Long-term antibacterial and biofilm dispersion activity of an injectable in situ crosslinked co-delivery hydrogel/microgel for treatment of implant infection. *Chem. Eng. J.*, 2022, vol. 433, article no. 134451. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.134451>
  15. Ma Q., Ma S., Liu J., Pei Y., Tang K., Qiu J., Wan J., Zheng X., Zhang J. Preparation and application of natural protein polymer-based Pickering emulsions. *E-Polymers*, 2023, vol. 23, article no. 20230001. <https://doi.org/10.1515/epoly-2023-0001>

## References

1. Larsson D. G. J., Flach C.-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2022, vol. 20, pp. 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
2. Frieri M., Kumar K., Boutin A. Antibiotic resistance. *J. Infect. Public Health*, 2017, vol. 10, pp. 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
3. Khameneh B., Diab R., Ghazvini K., Fazly Bazzaz B. S. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb. Pathog.*, 2016, vol. 95, pp. 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
4. French G. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, vol. 57,



16. Kuznetsov V. A., Kushchev P. O., Ostankova I. V., Pulver A. Y., Pulver N. A., Pavlovich S. V., Poltavtseva R. A. Modern Approaches to the Medical Use of pH- and Temperature-Sensitive Copolymer Hydrogels (Review). *Kondens. Sredy i Mezhfaznye Granitsy = Condens. Matter Interphases*, 2020, vol. 22, pp. 417–429. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2020.22/3113>
17. Zheng J., Zhu C., Xu X., Wang X., Fu J. Supramolecular assemblies of multifunctional microgels for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*, 2023, vol. 11, pp. 6265–6289. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.049>
18. Sahiner N. Amino acid-derived poly(L-Lysine) (p(LL)) microgel as a versatile biomaterial: Hydrolytically degradable, drug carrying, chemically modifiable and antimicrobial material. *Polym. Adv. Technol.*, 2020, vol. 31, pp. 2152–2160. <https://doi.org/10.1039/D3TB00346A>
19. Saveleva M. S., Lobanov M. E., Gusliakova O. I., Plastun V. O., Prikhozhdenko E. S., Sindeeva O. A., Gorin D. A., Mayorova O. A. Mucoadhesive Emulsion Microgels for Intravesical Drug Delivery: Preparation, Retention at Urothelium, and Biodistribution Study. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2023, vol. 15, no. 21, pp. 25354–25368. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
20. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, pp. 671–675. <https://doi.org/10.1002/nat.4936>
21. Abu T. M. M., Ghithan J., Abu-Taha M. I., Darwish S. M., Abu-hadid M. M. Spectroscopic approach of the interaction study of ceftriaxone and human serum albumin. *J. Biophys. Struct. Biol.*, 2014, vol. 6, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
22. Watanabe Y., Hayashi T., Takada R., Yasuda T., Saikawa I., Shimizu K. Studies on protein binding of antibiotics. I. Effect of cefazolin on protein binding and pharmacokinetics of cefoperazone. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1980, vol. 33, pp. 625–635. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
23. Shimizu T. Studies on protein binding of cefazolin and other antibiotics. *Jpn. J. Antibiot.*, 1974, vol. 27, pp. 296–301. <https://doi.org/10.1128/aac.01170-18>
24. Donnelly R. F. Stability of cefazolin sodium in polypropylene syringes and polyvinylchloride minibags. *Can. J. Hosp. Pharm.*, 2011, vol. 64, pp. 241–245. <https://doi.org/10.4212/cjhp.v64i4.1035>

Поступила в редакцию 15.03.2024; одобрена после рецензирования 22.05.2024; принята к публикации 03.06.2024  
The article was submitted 15.03.2024; approved after reviewing 22.05.2024; accepted for publication 03.06.2024