

УДК 537.311.322.678.01+541.69.616-008

**Э.Р. АРАКЕЛОВА, А.А. МИРЗОЯН, С.Г. БОЯДЖЯН, А.М. ХАЧАТРЯН,  
С.Л. ГРИГОРЯН, З.М. ФАРМАЗЯН, А.Б. МИРЗОЯН, М.А. ЕРАНОСЯН,  
Р.М. СТЕПАНЯН, Ф.С. КИНОЯН**

### **РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МЕТАЛЛОКСИДНЫХ КОМПОЗИЦИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ДОКСИЦИКЛИН**

Разработана технология формирования цинкоксидных композиций антибактериального препарата доксициклин (DOXY) в виде покрытий и композиционных плёнок с поливиниловым спиртом (ПВС). Цинкоксидные композиты доксициклина получены методом ДС-магнетронного нанесения наноразмерных плёнок ZnO на поверхность препарата в виде покрытий на стекле и композиционных плёнок с ПВС при низких температурах ( $-30^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$ ) подложки. Показано значительное увеличение антибактериальной активности цинкоксидных композиций лекарственного препарата DOXY в виде покрытий и композиционных плёнок с ПВС при толщинах наноразмерной плёнки ZnO порядка 90 нм. Цинкоксидные композиты доксициклина проявляют сильную антибактериальную активность, превосходящую исходный препарат при значительно меньших его концентрациях в композите.

***Ключевые слова:*** оксид цинка, магнетронное распыление, мишень, доксициклин, композиты, антибактериальная активность.

**Введение.** В современном материаловедении нанотехнологии в медицине являются одной из наиболее важных областей для получения наноразмерных материалов, в которой проявляются совершенно новые, а также их улучшенные свойства. Контролируя структуру материала в определённых наноразмерных интервалах, можно модифицировать поверхность с целью улучшения её технологических характеристик, таких как водорастворимость, биосовместимость или биоконъюгация. Наноразмерные материалы проявляют привлекательные свойства, такие как высокая стабильность и способность легко изменять поверхностные характеристики. Основные характеристики для доставки лекарственных средств в определённые органы ткани заключаются в том, что носитель должен быть достаточно мал для получения доступа к ним. Наноразмерные кристаллические материалы нашли широкое применение в областях микро- и наноэлектроники, а также диагностики и терапии антибактериальных препаратов [1 - 3]. Вопросы возникновения и развития резистентности к антимикробным препаратам во всём мире являются глобальной проб-

лемой для здравоохранения. Исходя из этого, появилась необходимость использования агентов, которые не вызывают резистентность и обладают хорошими бактерицидными свойствами. Новые способы получения, а также модифицирования антибактериальных препаратов с целью максимально эффективного их использования являются важной областью антибактериальной терапии.

Известно, что оксид цинка является как идеальным материалом для наноразмерной оптоэлектроники, так и эффективным материалом для биотехнологии ввиду наличия у него широкого диапазона наноструктур и благодаря его уникальным оптическим, электрическим, химическим, а также противоопухолевым и антибактериальным свойствам [4 - 6].

Ранее нами было показано, что цинкоксидные композиты известных противоопухолевых препаратов доксорубина и 5-фторурацила при определённых толщинах наноразмерных плёнок ZnO обладают вдвое более высокой противоопухолевой активностью и низкой токсичностью по сравнению с исходными препаратами и значительно более низкими дозами исходных препаратов в композиции по сравнению с терапевтическими дозами [7 - 10].

Целью настоящей работы является разработка технологии получения цинкоксидных композиций антибактериального препарата доксициклин. На рис 1а, б показана структура DOXY [11].

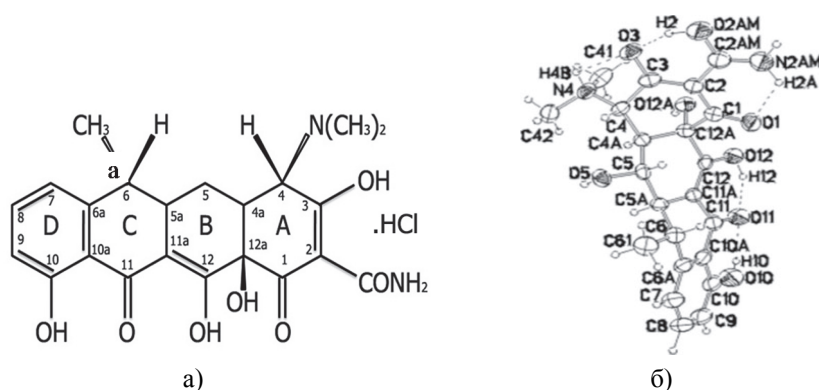


Рис. 1. Гидрохлорид доксициклина (а), структура катиона DOXY (б)

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Формирование покрытий DOXY.** Для формирования покрытий из DOXY был взят лиофилизированный порошок фирмы “Белмедпрепарат”, содержащий DOXY и маннитол в соотношении 1:4 (EBEWE Pharma). Покрытия из DOXY были получены на стеклянных подложках в виде пасты с диметил-

сульфоксидом (ДМСО). На стеклянную подложку оптимального диаметра наносилось определённое количество DOXY. Пасты были приготовлены исходя из максимально переносимых суточных доз для животных.

**1.2. Формирование композиционных плёнок из ПВС с DOXY.** Для формирования композиционных плёнок из ПВС и DOXY выбран полимер ПВС-5 ( $M_n = 65000$ , количество ацетатных групп – 1,6), отличающийся от остальных полимеров оптимальной растворимостью и пролонгированным действием [6, 7, 10]. Получены композиционные плёнки из оптимального 5%-го раствора ПВС-5 с определённым количеством DOXY при формировании терапевтических доз для исследования на животных (лаборатория токсикологии и химиотерапии НТЦ ОФХ НАН РА).

**1.3. DC-магнетронное осаждение тонких плёнок ZnO на поверхность DOXY в виде покрытий на стекле и композиционных плёнок с ПВС.** Цинкоксидные композиты доксициклина в виде покрытий на стекле и композиционных плёнок получены DC-магнетронным нанесением наноразмерной пленки оксида цинка в интервале толщин ( $d = 30...300 \text{ нм}$ ) на поверхность покрытий DOXY и комбинированных плёнок ПВС-5 с DOXY на модифицированной установке вакуумного напыления UVN-71-P3 (рис. 2).

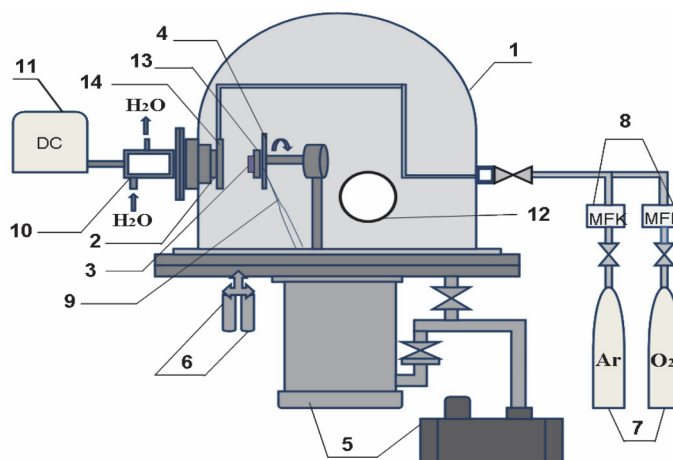


Рис. 2. Схема модернизированной DC-магнетронной установки:

1 - вакуумная камера; 2 - мишень; 3 - подложка; 4 - устройство для перемещения подложки; 5 - вакуумный насос; 6 - вакуумметр ионизационный; 7 - газы; 8 – регуляторы расхода газов; 9 - термопара; 10 - магнетрон; 11 - источник питания; 12 - смотровое окно; 13 - элемент Пельтье или нагреватель; 14 - цилиндрическая трубка подвода газовой смеси

При выборе технологических режимов осаждения наноразмерных пленок ZnO на поверхность препарата (соотношение рабочих газов – Ar:O<sub>2</sub>, ток магнетрона, расстояние мишень-подложка, температура подложки на поверхности противоопухолевого препарата в интервале температур  $-30^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$ ) приняты во внимание условия, предотвращающие нежелательные преобразования препарата. Установка оснащена системой измерения и контроля потока рабочего газа, а для осаждения пленок в температурном интервале  $-30^{\circ}\text{C} \geq T \geq -30^{\circ}\text{C}$  использовалась система на основе элемента Пельтье. Измерение и регулирование толщины пленки ZnO проведены системой автоматического управления "Микрон-7".

Наноразмерные пленки ZnO определенной толщины осаждались на поверхность противоопухолевых препаратов с точностью  $\pm 0,1$  нм.

**1.4. Методика определения *in vitro* и *in vivo* антибактериальной активности DOXY и их цинкоксидных композиций.** Проведены *in vitro* и *in vivo* исследования в лаборатории токсикологии и химиотерапии НТЦ ОФХ НАН РА. *In vitro* исследования проведены при использовании метода двукратного серийного разведения на штаммах Staphylococcus aureus 5 и Shigella Flexneri 6858. *In vivo* исследования проведены при генерализованной стафилококковой и дизентерийной инфекции белых мышей с использованием штаммов St. Aureus 5 и Sh. Flexneri 6858.

**2. Результаты экспериментов и их обсуждение.** Разработана технологическая схема формирования цинкоксидных композиций доксициклина на основе тонкопленочной технологии (рис. 3) с использованием схемы, составленной ранее для противоопухолевых препаратов доксорубицина и 5-фторурацила.

В эту схему включены следующие методики: формирование покрытий из DOXY, композиционных пленок из DOXY с ПВС-5; метод DC-магнетронного нанесения тонких пленок ZnO на поверхность антибактериального препарата доксициклина в виде покрытий и композиционных пленок с ПВС-5; *in vitro* и *in vivo* методы исследования антибактериальной активности.

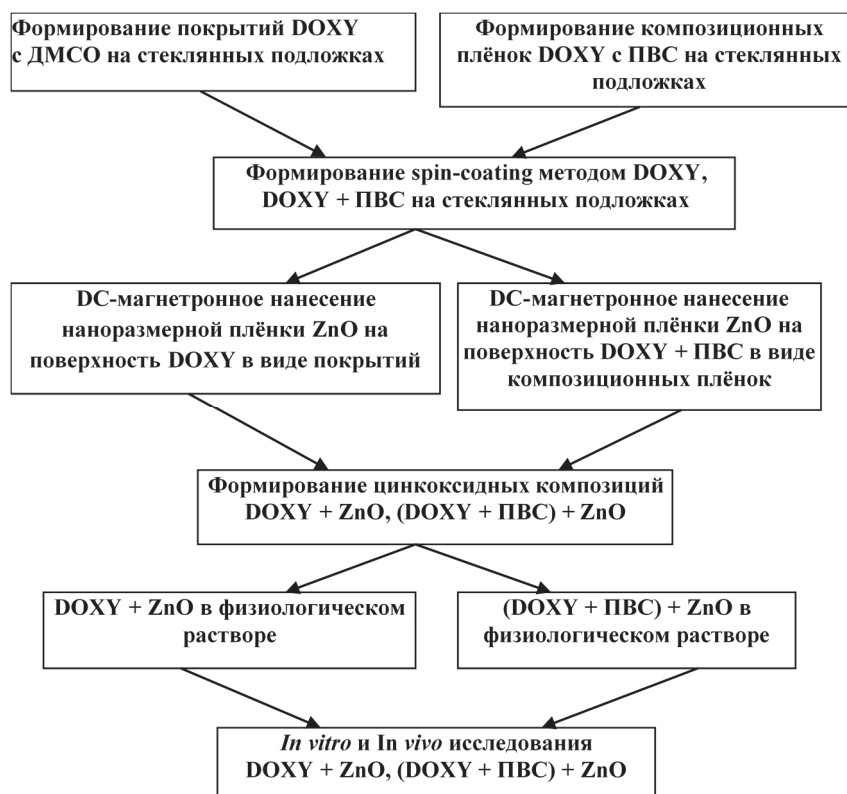


Рис. 3. Технологическая схема получения цинкоксидных композиций DOXY

Цинкоксидные композиты DOXY были получены DC-магнетронным нанесением наноразмерных пленок оксида цинка на поверхность покрытий и композиционных плёнок с ПВХ при оптимальных технологических параметрах их осаждения на стеклянных подложках:  $W = 120 \text{ Вм}$ ,  $\text{Ar} : \text{O}_2 = 70 : 30$ ; рабочее давление –  $10^{-3} \text{ мм рт.ст.}$ ,  $l = 130 \text{ мм}$ , приводящих к формированию кристаллических пленок оксида цинка на их поверхности, кристаллическим цинкоксидным композициям. Наноразмерные пленки ZnO определенной толщины наносились непосредственно на поверхность DOXY в виде покрытия, нанесенного на стеклянную подложку или в виде композиционной плёнки препарата DOXY с ПВХ.

На рис. 4 показаны дифрактограммы образцов оксида цинка на стеклянной подложке (а), доксицилина (b), цинкоксидных композиций DOXY (с). На рис. 5 приведены дифрактограммы образцов ПВХ и его цинкоксидных композиций при разных толщинах наноразмерных плёнок ZnO.

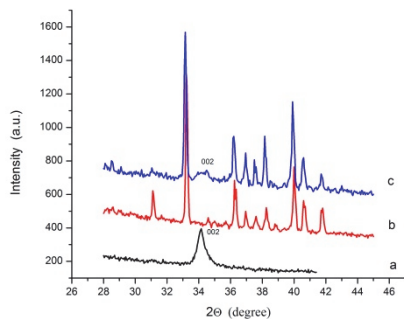


Рис. 4. Дифрактограммы образцов: а - ZnO, б - DOXY и с - цинкоксидных композиций DOXY при толщине плёнок ZnO 180 нм

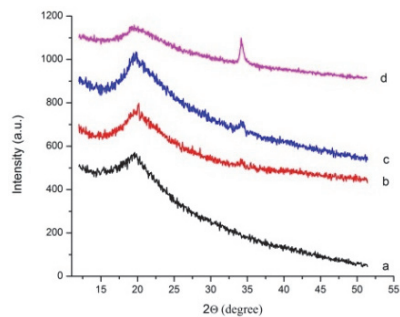


Рис. 5. Дифрактограммы образцов: а – PVC; б, с, d - цинкоксидных композиций PVC при разных толщинах плёнок ZnO: 60 нм (b), 90 нм (c), 180 нм (d)

Получены цинкоксидные композиты DOXY в виде покрытий и композиционных плёнок DOXY + PVC + ZnO при оптимальных технологических параметрах нанесения наноразмерных плёнок оксида цинка на их поверхности. Для цинкоксидных композиций доксициклина с PVC была выбрана полимерная матрица PVC-5 с целью пролонгированного действия цинкоксидных композиций в организме животных (мышей), как показано в работах [6, 7, 10].

*In vitro* исследования на цинкоксидных композитах доксициклина в виде композиционных пленок с PVC-5 с толщиной наноразмерных плёнок ZnO порядка 90 нм на штаммах *Staphylococcus aureus* 5 и *Shigella Flexneri* 6858 показали антибактериальную активность в два раза меньших концентрациях по сравнению с аптечным препаратом и в смеси с PVC-5. Цинк-оксидные композиты доксициклина в виде покрытий проявили аналогичную активность также при толщинах плёнок ZnO 90 нм. При толщине наноразмерных плёнок ZnO порядка 180 нм в виде покрытий и композиционных плёнок с PVC на обоих штаммах антибактериальная активность проявлялась в тех же концентрациях, как для исходного препарата.

*In vivo* исследования цинкоксидных композиций доксициклина на мышах для штамма *St. aureus* 5 в дозах 100 мг/кг в виде покрытий (DOXY + ZnO) и композиционных плёнок с PVC (DOXY + PVC + ZnO) на животных (мышах) показали значительно более высокую антибактериальную активность 94% (DOXY + ZnO) и 80% (DOXY + PVC + ZnO) по сравнению с исходным препаратом DOXY (76%) и DOXY + PVC (80%). При более низких концентрациях (50 и 25 мг/кг) наблюдается существенное увеличение активности цинкоксидных композиций доксициклина: 90, 80% и 72, 68% соответственно,

по сравнению с DOXY и DOXY + ПВС в тех же концентрациях (68, 40% и 60, 40% соответственно). Почти такая же разница наблюдалась для штамма *Sh. Flexneri* 6858.

Рентгеноструктурное исследование гидрохлорида доксициклина показало наличие внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей [11]. Протонированная амидная группа ориентирована так, что образуется внутримолекулярная водородная связь между амидным кислородом и  $O_3$  (рис. 1а). Сильная внутримолекулярная водородная связь между  $O_{10}$  и  $O_{11}$ , а также  $O_{11}$  и  $O_{12}$  стабилизирует геометрию колец В, С и D (рис. 1а). Каждый катион образует четыре межмолекулярные водородные связи с различными анионами хлорида [11].

Сравнение инфракрасных (ИК) (FTIR) спектров DOXY и DOXY + ZnO, снятых в вазелиновом масле, показало, что в области  $NH_2$ ,  $C=O$  и ароматического кольца сдвигов нет, только небольшой сдвиг заметен в  $\nu$  C-OH валентной области 3200, 3190. В деформационной области колебаний фенольного OH и в OH нет изменений.

В спектре DOXY + ZnO полосы поглощения ZnO смещены (435, 445) от его области  $418\text{ см}^{-1}$  ввиду поглощения самого соединения.

На атомно-силовом микроскопе (АСМ) сняты микрофотографии DOXY и цинкоксидного композита DOXY (DOXY + ZnO).

На рис. 6 а-в представлены снимки АСМ: DOXY, DOXY +ZnO (2D) и DOXY + ZnO (3D). Из рис. 6а и б очевидны упорядоченные гранулированные слои в отличие от DOXY (рис. 6а).

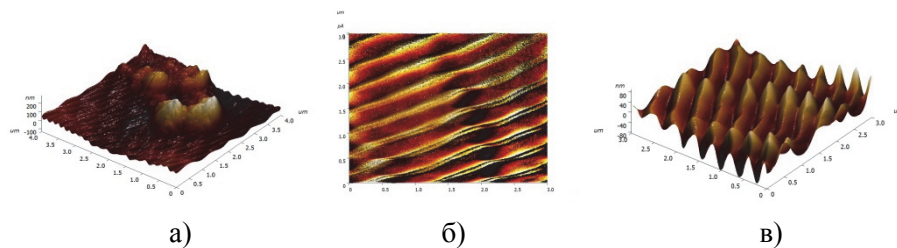


Рис. 6. АСМ - микрофотографии: а - DOXY; б - DOXY + ZnO (2D); в - DOXY + ZnO(3D)

Исследования будут продолжены с целью выяснения природы этих слоёв и их взаимосвязи с высокой антибактериальной активностью цинкоксидных композиций доксициклина по сравнению с самим препаратом.

## Выводы

1. Разработана технология получения цинкоксидных композиций DOXY, DOXY + ZnO осаждением наноразмерных плёнок оксида цинка на покрытия, композиционные плёнки препарата с ПВС, а также нанесением плёнок ZnO толщиной 90 нм на их поверхность методом ДС-магнетронного распыления цинковой мишени в интервале температур  $-30^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$  при рабочем давлении  $10^{-3}$  мм рт. ст.

2. Формирование цинкоксидных композиций доксицилина осаждением наноразмерной плёнки оксида цинка оптимальной толщины на определённую площадь поверхности препарата приводит к значительно большей антибактериальной активности и низкой токсичности по сравнению с исходным препаратом.

3. Векторный транспорт цинкоксидных композиций приводит к увеличению антибактериальной активности и снижению токсичности при меньших дозах препарата в композиции по сравнению с исходным препаратом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J.** Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents // *Langmuir*.- 2002.- 18.- P. 6679 - 6686.
2. A high-throughput labelfree nanoparticle analyser / **J.L. Fraikin, T. Teesalu, M.C. McKenney, E. Ruoslahti, et al** // *Nature Nanotechnology*.- 2011.- 6.- P. 308 – 313.
3. **Karunakaran C., Rajeswari V., Gomathisankar P.** Optical, electrical, photocatalytic, and bactericidal properties of microwave synthesized nanocrystalline Ag–ZnO and ZnO // *Solid State Sciences*.- 2011.- 13 (5).- P. 923 - 928.
4. **Jingyuan Li Dadong, Guo Xuemei Wang, Huangping Wang Hui, Jiang Baoan Chen.** The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation in Vitro // *Nanoscale Res Lett*.- 2010.- 5.- P. 1063 - 1071.
5. **Meruvu Meena Vangalapati, Seema Chaitanya Chippada and Srinivasa Rao Bammidi.** Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles and its antimicrobial activity against *Bacillus Subtilis* and *Esherichia Coli* // *Rasayan J.CHEM*.- 2011.- 4 (1).- P. 217 - 222.
6. **Мирзоян А.А., Аракелова Э.Р., Фармазян З.М., Григорян С.Л.** Цинкоксидные композиты противоопухолевого лекарственного препарата доксорубицин // *Вестник НПУА: - Металлургия, материаловедение, недропользование*.- 2015.- N2.- С. 41 – 51.
7. New Drug Delivery System for Cancer Therapy / **Emma R. Arakelova, Stepan G. Grigoryan, Ashot M. Khachatryan, et al** // *International Journal of Medical Science and Engineering*.- 2013.- 7 (12).- P. 1075 - 1080.

8. In vitro and in vivo Anticancer Activity of Nanosize Zinc Oxide Composites of Doxorubicin / **E.R. Arakelova, S.G. Grigoryan, F.G. Arsenyan, et al** // International Journal of Medical, Pharmaceutical Science and Engineering.- 2014.- 8 (1).- P. 38 – 43.
9. In vitro study of anticancer activity of polymer based DOX ZnO compositions: the case of vinyl alcohol (co) polymers / **Emma R. Arakelova, Zoya M. Farmazyan, Ashot M. Khachatryan, et al** // J.Nanogenomics and Nanomedicine.- 2014.- 2 (1).- P. 1 – 11.
10. Цинкоксидные композиты противоопухолевого лекарственного препарата 5-фторурацил / **Э.Р. Аракелова, А.А. Мирзоян, С.Л. Григорян, С.Г. Григорян и др.** // Вестник, НПУА: Metallurgy, materials science, nanotechnology.- 2016.- №2.- С. 48 – 58.
11. **Frank W. Heinemann, Clemens F. Leipold, Cyprian R. Roman, Mattias O. Schmitt, Siegfried Schneider.** X-ray Crystallography of Tetracycline, Doxycycline and Sanicycline // J. Chem. Crystallogr.- 2013.- 43.- P. 213 – 222.

**Է.Ռ. ԱՌԱՔԵԼՈՎԱ, Ա.Ա. ՄԻՐԶՈՅԱՆ, Ս.Գ. ԲՈՅԱԶՅԱՆ, Ա.Մ. ԽԱՀԱՏՐՅԱՆ,  
Ս.Լ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Զ.Մ. ՖԱՐՄԱԶՅԱՆ, Ա.Բ. ՄԻՐԶՈՅԱՆ, Մ.Ա. ԵՐԱՆՈՍՅԱՆ,  
Հ.Մ. ԱՏԵՓԱՆՅԱՆ, Ֆ.Ս. ԿԻՆՈՅԱՆ**

**ՀԱԿԱՔԱԿՏԵՐԻԱԿԱՆ ԴՈՔՍԻՑԻԿԼԻՆ ԴԵՂԱՆՅՈՒԹԻ  
ՄԵՏԱՂՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ԿՈՄՊՈԶԻՏՆԵՐԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՅԻ  
ՄՇԱԿՈՒՄԸ**

Մշակված է հակաբակտերիական դոքսիցիկլին դեղանյութի ծածկույթների և պոլիվինիլ սպիրտի /ՊՎՍ/ հետ կոմպոզիցիոն թաղանթի տեսքով ցինկօքսիդային կոմպոզիցիաների ստացման տեխնոլոգիա: Դոքսիցիկլին ցինկօքսիդային կոմպոզիցիաները ստացվել են ապակու վրա ծածկույթների և կոմպոզիցիոն թաղանթների տեսքով դեղանյութի մակերեսին DC-մագնետրոնային եղանակով ZnO թաղանթի նստեցումով տակդիրի ցածր ջերմաստիճանների՝  $-30^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$  պայմաններում: Ցույց է տրված դեղանյութի ցինկօքսիդային կոմպոզիցիաների հակաբակտերիական ակտիվության զգալի աճ ինչպես ծածկույթների, այնպես էլ կոմպոզիցիոն թաղանթների տեսքով ZnO թաղանթի 90 –նմ կարգի հաստության դեպքում: Դոքսիցիկլինի ցինկօքսիդային կոմպոզիտները ցուցաբերում են հակաբակտերիական բարձր ակտիվություն ելային դեղանյութի համեմատությամբ՝ կոմպոզիտում դեղանյութի զգալիորեն ավելի փոքր պարունակության դեպքում:

**Առանցքային բառեր.** ցինկի օքսիդ, մագնետրոնային փոշեցրում, թիրախ, դոքսիցիկլին, կոմպոզիտներ, հակաբակտերիական ակտիվություն:

**E.R. ARAKELOVA, A.A. MIRZOIAN, S.G. BOYAJYAN,  
A.M. KHACHATRYAN, S.L. GRIGORYAN, Z.M. FARMAZYAN,  
A.B. MIRZOYAN, M.A. ERANOSYAN, H.M. STEPANYAN, F.S. KINOYAN**

**DEVELOPING A TECHNOLOGY FOR OBTAINING METALLOOXIDE  
COMPOSITIONS OF THE ANTIBACTERIAL DRUG DOCSICICLINE**

A technology for the formation of zinc oxide compositions of the antibacterial drug doxycycline (DOK) in the form and composite films with polyvinyl alcohol (PVA) has been developed. The optimal technological parameters of deposition of nanosize zinc oxide films on the surface of antibacterial drug in the form of coatings and composite films with PVA are determined. Zinc oxide composites of doxycycline were obtained by DC magnetron deposition of nanosized ZnO films on the surface of the preparation in the form of coatings on glass and composite films with PVA at low temperatures ( $-30^{\circ}\text{C} \leq T \leq 30^{\circ}\text{C}$ ) of the substrate. A significant increase in the antibacterial activity of the zinc oxide compositions of the DOK was shown both in the form of coatings and composite films with PVA at thicknesses of a nanosized ZnO film of the order of 90 nm. The zinc oxide composites of doxycycline show a strong antibacterial activity superior to the original preparation with significantly lower concentrations in the composite.

**Keywords:** zinc oxide, magnetron sputtering, target, doxycycline, composites, antibacterial activity.