ISSN 2079-1704. Хімія, фізика та технологія поверхні. 2024. Т. 15. № 3. С. 349-360

УДК 620.3:60+544.7 doi: 10.15407/hftp15.03.349

В.І. Подольська [1], Л.С. Рєзніченко [1], Л.М. Якубенко [1], Т.Г. Грузіна [1], Н.М. Жолобак [2], Ю.М. Самченко [1], С.М. Дибкова [1]

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ІЗ СУЛЬФАЦЕТАМІДОМ НАТРІЮ

[1] Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка Національної академії наук України
бульв. Академіка Вернадського, 42, 03680, Київ, Україна, E-mail: vi.podolska@gmail.com
[2] Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України
вул. Академіка Заболотного, 154, 04073, Київ, Україна

Дане дослідження присвячене вивченню наносистеми, яка включала наночастинки золота у водному розчині сульфацетаміду натрію, з метою встановлення природи і ефективності їхньої взаємодії в залежності від концентрації і pH середовища. Сульфацетамід натрію становить інтерес в зв'язку з можливістю його використання в складі нових гідрогелевих матеріалів з інкорпорованими наночастинками золота для виготовлення офтальмологічних імплантів. Використано наночастинки золота середнього розміру 20 нм, одержані методом гідротермального синтезу. Дослідження цитотоксичності сульфацетаміду натрію на основі інтегрального показника індексу метаболічної активності клітин МА-104 дозволило встановити концентрації, які є базисом для пояснення імовірної токсичної дії матеріалів, імпрегнованих розчинами сульфацетаміду натрію. Індиферентною слід вважати концентрацію 0.1 % розчину сульфацетаміду натрію за умови 24 год контакту з клітинами і 0.05 % за умови 48 год контакту. Ефективність взаємодії сульфацетаміду натрію і наночастинок золота оцінювали методами UV-Vis спектроскопії, електрокінетичних вимірювань, сканувальної електронної мікроскопії. Спектральні дослідження суспензії наночастинок золота в розчинах сульфацетаміду натрію у діапазоні терапевтичних концентрацій 5÷30 % виявили немонотонний концентраційно-залежний вплив сульфаніламідного препарату на інтенсивність поглинання у видимому і ультрафіолетовому діапазонах. Встановлено розширення смуги поверхневого плазмоннного резонансу наночастинок золота в присутності зростаючих концентрацій сульфацетаміду і поява смуги поглинання в довгохвильовій області. Встановлено зміщення піків на УФ-спектрах після додавання наночастинок золота до сульфацетаміду натрію. Встановлено підвищення негативних значень електрокінетичного потенціалу наночастинок золота під впливом сульфацетаміду від –26.2 до –41.4 мВ. Одержані дані вказують на хімічну взаємодію між наночастинками золота і сульфацетамідом натрію в його розчинах, що дозволяє визначати умови застосування у складі композитних матеріалів біомедичного призначення для зменшення токсичності і швидкості вимивання.

***Ключові слова**: сульфацетамід натрію, альбуцид, цитотоксичність, наночастинки золота, взаємодія, спектри поглинання, електрокінетичний потенціал*

ВСТУП

Використання наночастинок золота для створення нових функціональних структур медичного призначення і платформи для транспорту ліків до уражених тканин останніми роками викликає значний інтерес дослідників [1]. Завдяки унікальним хімічним властивостям наночастинки золота, з одного боку, мають значний потенціал у прояві протизапальної, ранозагоювальної та регенераційної дії [2, 3], а з іншого, виявляють модулюючі властивості при взаємодії з субстанціями різної природи [4, 5]. Останнє дозволяє постійно розширювати та істотно покращувати підходи до отримання нових композитних матеріалів із заданими експлуатаційними параметрами [6].

Серед сучасних засобів лікування інфекцій, спричинених мікроорганізмами, що належать переважно до видів *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia spp*, *Staphylococcus spp* [7], сульфаніламідні препарати [8, 9], зокрема Альбуцид (діюча речовина сульфацетамід натрію) [10], посідають важливе місце. Водночас, поряд із терапевтичною ефективністю, сульфацетамід натрію проявляє значну подразнюючу, а отже, токсичну дію, яку слід враховувати при його застосуванні. Особливо це важливо при створенні нових гібридних гідрогелевих

© В.І. Подольська, Л.С. Рєзніченко, Л.М. Якубенко, Т.Г. Грузіна, Н.М. Жолобак, Ю.М. Самченко, С.М. Дибкова, 2024

матеріалів медичного призначення [11, 12]. Так, використання наночастинок золота у гібридних гідрогелевих матрицях, просочених сульфацетамідом натрію, викликало уповільнення його вивільнення по мірі підвищення вмісту наночастинок золота у гідрогелях, що може бути результатом взаємодії цих компонентів [13]. З іншого боку, результатом такої взаємодії може бути і зменшення рівня токсичності самого сульфацетаміду натрію. В літературі є чисельні дані щодо зменшення токсичності органокомплексів наночастинок золота з фармацевтичними субстанціями [14, 15].

Для оцінки можливості модуляції рівня токсичності сульфацетаміду натрію в системі з наночастинками золота необхідно дослідити перш за все особливості їхньої взаємодії. З цією метою в даному дослідженні були вивчені цитотоксичні властивості сульфацетаміду натрію, спектральні характеристики і електроповерхневі властивості наночастинок золота у розчинах сульфацетаміду натрію в залежності від pH і концентрації останнього.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Тестування цитотоксичності сульфацетаміду натрію проводили з використанням еукаріотичних клітин лінії МА104 з колекції культур клітин Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Клітини вирощували у моношаровій культурі у пластикових флаконах з площею дна 75 $см^2$ у поживному середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної сироватки телят (ЕСТ) та антибіотика-антимікотика при 37 °С в умовах постійного рівня CO_2 (5 %). Для оцінки стану клітин після їхнього контакту з сульфацетамідом натрію у різних концентраціях було використано тест з кристалічним фіолетовим (КФ) та МТТ (метилтетразолієвий)-тест, які дозволяють охарактеризувати ключові показники життєздатності клітин: загальну кількість адгезованих клітин та їхню метаболічну активність. З метою узагальнення та аналізу результатів, отриманих в МТТ-тесті та в тесті з кристалічним фіолетовим, було використано інтегральний показник – індекс метаболічної активності клітин (ІМА) [16, 17].

Формування наночастинок золота (АuНЧ) проводили згідно [18, 19] у модифікації. Золотохлористоводневу кислоту ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, Sigma-Aldrich) відновлювали цитратом натрію у присутності карбонату калію (121 °С, 1.04 атм, 15 хв). В результаті отримували водну дисперсію червоно-винного кольору із середнім розміром частинок 20 нм. Суспензія після повільного охолодження зберігалась при 4 °С.

Наночастинки золота характеризували методом UV-Vis спектроскопії на спектрофотометрі СФ-46 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Росія) при 300–800 нм. Сульфацетамід натрію ($C_8H_9N_2NaO_3S \cdot H_2O$, Katwijr chemie B.V., Нідерланди) і наночастинки золота в розчині сульфацетаміду натрію характеризували методом UV-спектроскопії при 190–350 нм. До спектрів в окремих випадках застосовано нормування в інтервалі від 0.0 до 1.0 відносно значень поглинання при λ_{max} за допомогою комп'ютерної програми ORIGIN 10.5.

Електроповерхневі властивості НЧ золота оцінювали за методою мікроелектрофорезу в комірці закритого типу (плаский кварцовий капіляр шириною 10 мм і товщиною 1 мм). Вимірювання вели при 24±0.5 °С. Електрокінетичний потенціал (ζ) розраховували за формулою Гельмгольця - Смолуховського [20].

Зображення наночастинок золота до і після контакту з розчином сульфацетаміду натрію були одержані з використанням сканувальної електронної мікроскопії (Tescan MIRA 3 LMU, обладнаний енергодисперсійним спектрометром Oxford X-Max 80 із системою підготування проб PECS Gatan 682, Чехія).

Статистична обробка результатів дослідження. Дані досліджень цитотоксичності та параметри, що визначаються, статистично оброблені та представлені як медіана з міжквартильним діапазоном AUC: Me (LQ–UQ), де Me = медіана (50 % процентиль), LQ = 25 % процентиль, та UQ = 75 % процентиль. Статистичні розрахунки проведено за допомогою програмного забезпечення Stat Plus Pro 5.9.8. та STATISTICA v.10 (Система аналізу експериментальних даних, StatSoft, Inc. 2011).

Всі реагенти були аналітичної чистоти, розчини готувались на очищеній воді, використовуючи Millipore Milli-Q систему.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Наразі немає чіткого уявлення щодо рівнів цитотоксичності сульфацетаміду натрію. Наявні в літературі і фармакопеях дані

стосуються переважно алергічних реакцій. Щодо цитотоксичності, вони вкрай обмежені і суперечливі. Так, в роботі [21] методом культивування клітин *in vitro* досліджено цитотоксичність зшитого поліуретанового композиту, імпрегнованого Альбуцидом і зроблено висновок про його нетоксичність, проте не вказано робочу концентрацію препарату. Існують окремі дослідження, які стосуються вивчення цитотоксичності на ракових клітинах [9]. Встановлено індукцію двох форм автофагії: індукції смерті або цитопротекторної автофагії в діапазоні концентрацій сульфацетаміду 10–50 мМ [22].

Оскільки в літературі відсутні дані щодо діапазонів цитотоксичних і не цитотоксичних концентрацій сульфацетаміду натрію, на першому етапі досліджень проведено визначення цитотоксичності цієї субстанції в культурі еукаріотичних клітин лінії МА 104.

Отримані результати метаболічної активності та загальної кількості адгезованих клітин МА104 через 24 і 48 год контакту різних концентрацій тест-розчину наведено в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1. Токсичність розчину сульфацетаміду натрію для клітин МА-104 через 24 год контакту за показниками МТТ- та КФ-тесту та індексом метаболічної активності

Показник	Концентрація розчину сульфацетаміду натрію (мг/мл)									Контроль клітин
	30	15	7.5	3.8	1.9	0.9	0.5	0.2	0.1	
МТТ	42	80	110	116	114	105	102	100	98	100
КФ	17	67	87	101	106	103	105	96	103	100
ІМА	2.46	1.20	1.26	1.15	1.07	1.02	0.97	1.05	0.96	1.00

Примітка: МТТ – відсоток метаболічно активних клітин відносно контрольних інтактних, КФ – відсоток адгезованих клітин, розрахований відносно контрольних інтактних, прийнятих за 100 %, ІМА – індекс метаболічної активності клітин, розрахований як відношення значення МТТ до значення КФ

Таблиця 2. Токсичність розчину сульфацетаміду натрію для клітин МА-104 через 48 год контакту за показниками МТТ- та КФ-тесту та індексом метаболічної активності

Показник	Концентрація розчину сульфацетаміду натрію (мг/мл)								Контроль клітин
	30	15	7.5	3.8	1.9	0.9	0.5	0.2	
МТТ	14	55	97	120	120	112	106	103	100
КФ	2	60	85	93	95	99	101	99	100
ІМА	8.68	0.92	1.14	1.30	1.25	1.13	1.05	1.04	1.00

Слід зазначити відмінність в результатах, отриманих на клітинах в тотожних умовах культивування: якщо зменшення токсичності сульфацетаміду натрію відбувається лінійно за обліку кількості адгезованих клітин із застосуванням тесту з кристалічним фіолетовим, то тест із МТТ, який дозволяє оцінити метаболічну активність клітин, виявляє їхню нелінійну відповідь, зумовлену надактивацією клітин у субтоксичних концентраціях сульфацетаміду натрію. З метою деталізації особливості реагування клітин нами застосовано критерій «індекс метаболічної активності клітин» ІМА, який є інтегральним показником параметрів, отриманих в обох тестах. Індекс метаболічної активності клітин визначали як відношення відсотка метаболічно активних клітин до відсотка усіх адгезованих клітин. Відповідно, для контрольних інтактних клітин, ІМА становить 1.0. Показник вище 1.0 свідчить, що активність клітин після контакту зі зразком (середовищем) є вищою. І навпаки – зниження показника нижче 1.0 свідчить про зниження метаболічної активності клітин.

У тесті з кристалічним фіолетовим показано, що контакт клітин МА-104 з різними концентраціями розчину сульфацетаміду натрію супроводжується токсичними ефектами. При порівнянні результатів таблиць 1 і 2 можна констатувати, що нетоксичною концентрацією для клітин

МА-104 за умови 24 год контакту є 4 мг/мл, за умови 48 год контакту така концентрація становить 1 мг/мл. Концентрація, яка викликає 50 % деструкції моношару клітин, становить ~25 мг/мл за умови 24 год контакту та ~18 мг/мл за умови 48 год контакту.

У тесті з МТТ виявлено, що 24 год контакт клітин МА-104 з різними концентраціями розчину сульфацетаміду натрію супроводжується пригніченням їхньої метаболічної активності на 50 % за концентрації ~28 мг/мл з наступним наростанням метаболічної активності вище показника контролю інтактних клітин у субтоксичних концентраціях: 1.5–8.0 мг/мл та нормалізацією показників за концентрації 0.7 мг/мл і нижче. За умови 48 год контакту відповідні показники складають 18, 0.7–4.0 та 0.4 мг/мл.

Застосування показника індексу метаболічної активності клітин (IMA) до розчину сульфацетаміду натрію дозволило чітко ідентифікувати діапазони концентрацій, які є цитотоксичниими або справляють субтоксичну дію. Загалом, індиферентною для клітин МА104 виявилася концентрація розчину сульфацетаміду натрію, яка становить 1 мг/мл, або 0.1 % розчин за умови 24 год контакту з клітинами. За умови 48 год контакту з клітинами така концентрація є вдвічі нижчою – 0.5 мг/мл, або 0.05 %.

Разом з тим, терапевтичні концентрації розчинів сульфацетаміду натрію, які широко застосовуються у офтальмологічній практиці, складають 6÷30 % [10]. Тому, при дослідженні особливостей взаємодії сульфацетаміду натрію з наночастинками золота було вивчено діапазон концентрацій сульфацетаміду 5÷30 %.

Спектральна характеристика наночастинок золота (AuНЧ), синтезованих з метою вивчення їхньої взаємодії з сульфацетамідом натрію (САН), наведена на рис. 1. Синтезовані AuНЧ демонстрували на спектрах інтенсивну класичну смугу поглинання з максимумом при λ_{max} = 520 нм, яку пов'язують з поверхневим плазмонним резонансом (ППР) електронів, тобто з осциляцією вільних електронів на поверхні твердого матеріалу (рис. 1, крива 1). Це не суперечить даним, наведеним в інших роботах, для сферичних наночастинок золота розміром ≥ 10 нм [18, 23]. Пік гострий, правильної форми, що свідчить про достатньо вузький розподіл частинок за розміром. Додавання до даної наносистеми електроліту 25 мМ NaCl привело до невеликого зміщення правої гілки спектру поглинання в червону область. При цьому максимум розширився до λ_{max} = 520÷530 нм (рис. 1, крива 2).

Спектри поглинання AuНЧ у видимому діапазоні частот після їх контакту з розчинами САН у діапазоні концентрацій 5÷30 % наведені на рис. 2. САН належить до групи сульфаніламідів – похідних сульфанілової кислоти. Завдяки своїй хімічній будові: наявності первинної ароматичної аміногрупи і сульфамідної групи, - сполука має амфотерні властивості [23, 24]. Ароматична аміногрупа виявляє лужні властивості, а сульфамідна – кислотні.

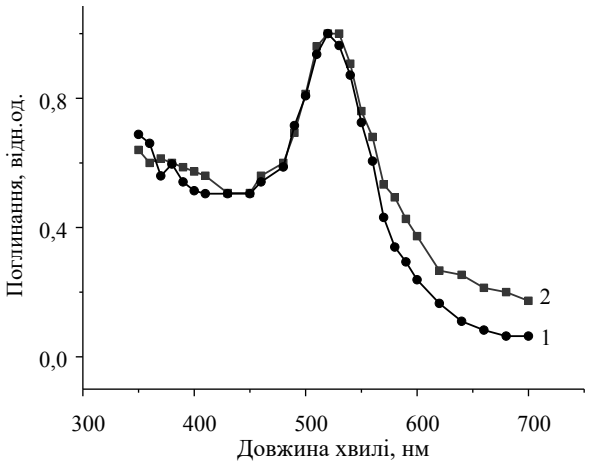


Рис. 1. Нормовані спектри поглинання наночастинок золота в дистильованій воді (*1*) і в 25 мМ розчині NaCl (*2*). Криві нормовані відносно поглинання при λ_{max}

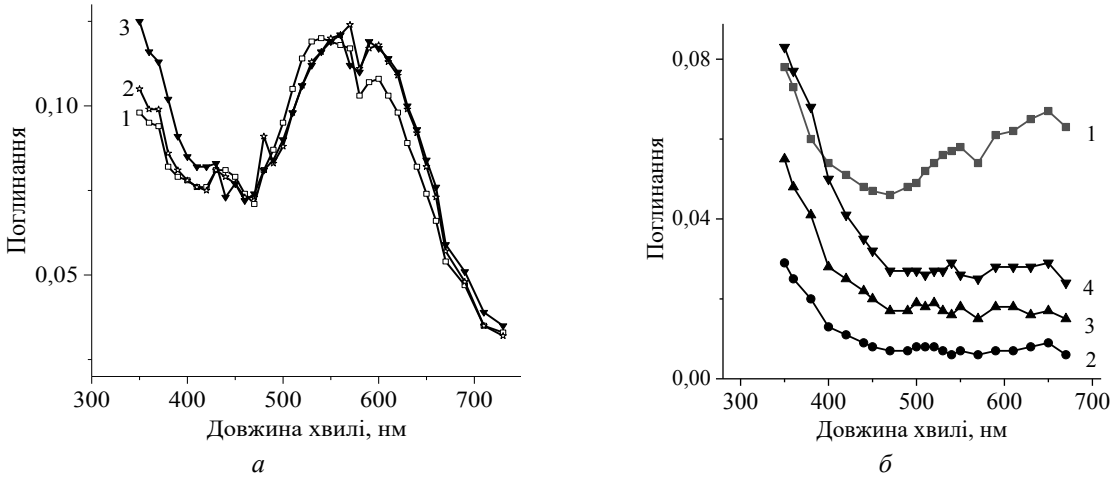


Рис. 2. Залежність спектрів поглинання наночастинок золота від концентрації сульфацетаміду натрію. (*а*) – після 1 год контакту: *1* – 5 %, *2* – 15 %, *3* – 30 %. (*б*) – після 48 год контакту: *1* – 5 %, *2* – 10 %, *3* – 20 %, *4* – 30 %

При порівнянні спектрів розчинів САН після 1-годинного контакту (рис. 2 *а*) зі спектром АuНЧ без добавок (рис. 1, крива 1), помітно значне розширення смуги ППР. При вмісті САН 15 і 30 % максимум істотно змістився в червону область до 560 і 570 нм, відповідно. Другий максимум, інтенсивність якого зростала з концентрацією САН, зміщений в червону область до λ_{max} = 600 нм. Інша особливість спектрів, характерна для дослідженого діапазону концентрацій САН, – поява додаткового плеча в області 430–440 нм.

Спостережувані зміни на спектрах в області смуги ППР можуть бути пов'язані зі зміною агрегативної стійкості і формуванням декількох фракцій НЧ або агрегатів з наночастинок з відповідними максимумами поглинання, які спричинені взаємодією АuНЧ із САН. Спостерігалася зміна забарвлення АuНЧ від малинового до фіолетового. В 5 %-ному розчині протягом першої години інкубування спостережувані зміни були повільними і малопомітними. Із збільшенням концентрації сульфатацетаміду натрію, зміна кольору в аналогічних умовах відбувалася досить швидко.

На підтвердження концентраційно залежного механізму взаємодії побічно свідчать аналогічні спектри, записані через 48 год контакту (рис. 2 *б*). Як видно, інтенсивність плазмонних ефектів порівняно з даними на рис. 2 *а* була помітно меншою. Залежність поглинання від концентрації була немонотонною. Інтенсивність смуги поглинання, що відповідає ППР при концентраціях САН 10 і 20 %, була в рази меншою, ніж в 5 %-му розчині САН (рис. 2 *б*, крива 1). Максимум в 5 % розчині зсунутий до 550 нм. Також відмічене поглинання в більш довгохвильовій області при 650 нм, що може вказувати на формування певної сполуки золота з САН.

Додаткову інформацію про систему АuНЧ-САН можна одержати, проконтролювавши її спектральну поведінку в УФ-діапазоні. УФ-спектроскопія є поширеним методом якісного і кількісного визначення концентрації САН у водних розчинах в діапазоні 255–272 нм [25, 26]. УФ-характеристики поглинання САН використовують для ідентифікації даної сполуки. Відзначають чутливість спектрів сульфаніламідів до pH.

Спектр поглинання 30 %-вого розчину САН в 10 мМ NaCl наведений на рис. 3. Він відповідає певним визначеним стандартним показникам для сульфацетаміду натрію [25].

На рис. 4 *а* наведені спектри розчинів, що містили 5, 10, 20 і 30 % САН і одночасно АuНЧ та фоновий електроліт NaCl. Помічено цікаву особливість: інтенсивність поглинання в дослідженому діапазоні довжин хвиль 190–350 нм немонотонно залежала від концентрації сульфаніламіду. При концентраціях САН 10 і 20 % (рис. 4 *а*, криві 2 і 3) цей показник майже вдвічі перевищував показник поглинання в 5 і 30 % розчинах (рис. 4 *а*, криві 1 і 4). Одночасно при

концентраціях САН 5 і 30 % інтенсивність поглинання в суспензії з АuНЧ була майже співмірна з 30 % сульфаніламідним препаратом без АuНЧ (рис. 4 *а*, крива 5), тобто, при взаємодії електронодонорних груп САН з золотом при певних концентраціях в лужному середовищі поглинання істотно посилилось.

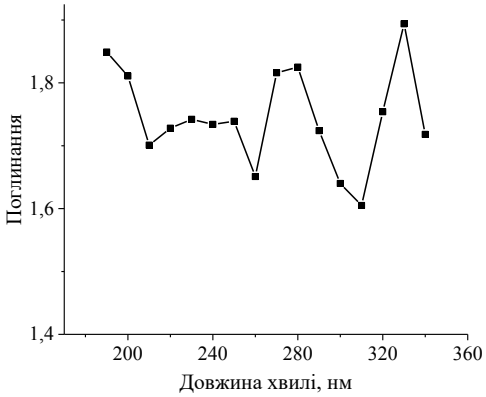


Рис. 3. УФ-спектр поглинання 30 % розчину сульфацетаміду натрію в 10 мМ NaCl

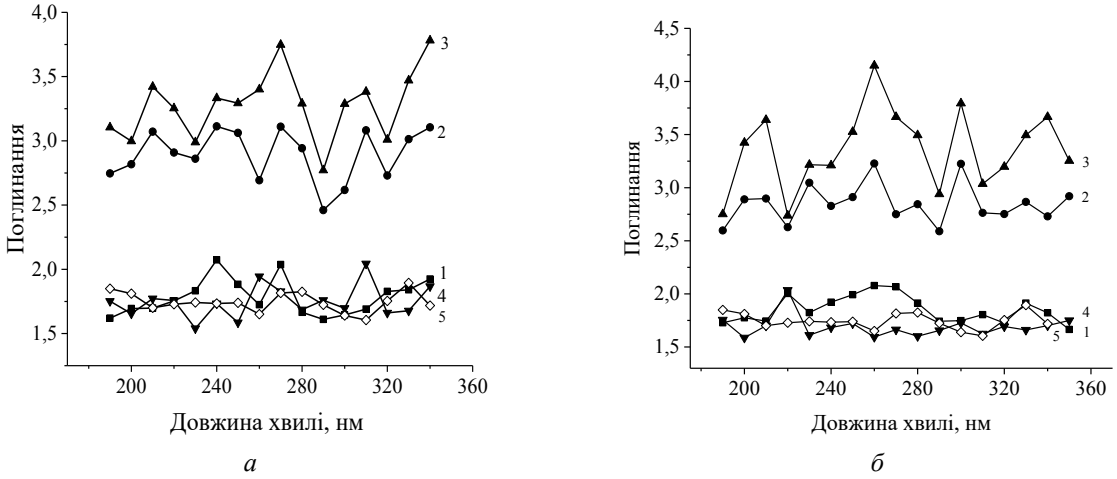


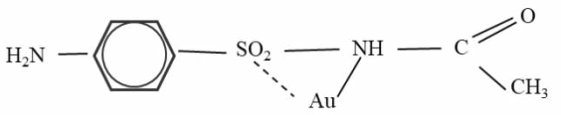
Рис. 4. Залежність спектрів поглинання сульфацетаміду натрію з доданими наночастинками золота від концентрації САН: (*а*) – після 1 год контакту, (*б*) – після 48 год контакту: *1* – 5 %, *2* – 10 %, *3* – 20 %, *4* – 30 %, *5* – 30 % розчин сульфацетаміду без додавання наночастинок золота

В присутності АuНЧ збільшилась кількість спектральних смуг. Основна характеристична смуга САН при 270–280 нм (рис. 3) стала вужчою з максимумом при 270 нм у змішаних розчинах з концентрацією 5, 10, 20 %. При концентрації 30 % максимум характеристичної смуга змістився в бік коротких ультрафіолетових хвиль до 260 нм (рис. 4 *а*, крива 4).

Аналогічно до експериментів у видимому діапазоні, було записано УФ-спектрограми через 48 год контакту, щоб оцінити подальші зміни в системі САН-АuНЧ. Порівнюючи залежності, наведені на рис. 4 *а* і рис. 4 *б* для концентрацій САН 5, 10 і 20 %, можна зауважити, що 48 год контакт супроводжувався зсувом максимумів 270 нм і 310 нм до 260 нм і 300 нм, відповідно. При концентрації 5 % смуга поглинання значно розширилась. У 30 %-му розчині смуга поглинання сульфацетаміду натрію при 260 нм практично відсутня, проте помітне поглинання відбувалось при 220 нм. Зміни в інтенсивності поглинання та зміщення піків на УФ-спектрах в перший і, особливо, на другий день після додавання наночастинок золота до САН, свідчать на користь того, що частинки золота можуть взаємодіяти з САН.

САН задяки сульфамідній групі є досить активною хімічною речовиною. В лужному середовищі утворюються забарвлені комплекси або осади з деякими іонами важких металів [24]. За хімічною будовою САН є доволі близьким до амінокислоти. Активні центри амінокислот: аміногрупи, карбоксильні групи та сірка, – також містять багаті на електрони азот, кисень і сірку, які можуть передавати електронну густину від своєї єдиної електронної пари до золота [27]. Явище взаємодії амінокислот із золотом використовують зокрема в гідрометалургійному процесі для його вилуговування. В роботах [28, 29] наведені результати застосування амінокислот гліцину і глутамату при pH 9.4 і 11.0, а також аланіну і гістидину. Розрахунок вільної енергії Гіббса для всіх амінокислот показав, що взаємодія 2-х атомних кластерів або катіонів золота з протонованими і депротонованими амінокислотними залишками суттєво не відрізняється, тобто мало залежить від pH і визначається переважно будовою і активними групами амінокислоти [27].

Беручи до уваги наведені вище дані, а також зафіксовані зміни на спектрах поглинання, припущення про хімічну взаємодію між золотом і САН (при певних експериментальних умовах – лужне середовище, концентрація тощо) виглядає досить ймовірним. Електростатична компонента не відіграє вирішальної ролі при формуванні заряду наночастинок золота в розчині САН. Важливішу роль відіграють електронні зв'язки за рахунок активних груп САН**.** Зв'язки є частково електростатичні і частково ковалентні [27]. Враховуючи значну схожість хімічного складу амінокислот і САН, можна зробити припущення, що комплекс САН з золотом формується на поверхні НЧ золота і виглядає наступним чином:



Співвідношення компонентів золота і САН в комплексі ймовірно становитиме 1:1. Говорити про наявність трьох лігандів можна лише за певних умов, наприклад в дуже лужному середовищі, великій концентрації тощо.

Як співвідносяться зміни спектральних характеристик із зміною електрокінетичного потенціалу НЧ золота після їхнього контакту з САН і яка роль належить pH дисперсійного середовища? Досліджено вплив величини pH в інтервалі 3.5÷11.7 на ζ-потенціал AuНЧ. Дані наведені на рис. 5. Фоновим електролітом слугував 10 мМ розчин NaCl. Розчин з такою величиною іонної сили забезпечує його достатню електропровідність і рекомендований для вимірювання ζ-потенціалу AuНЧ [29, 30].

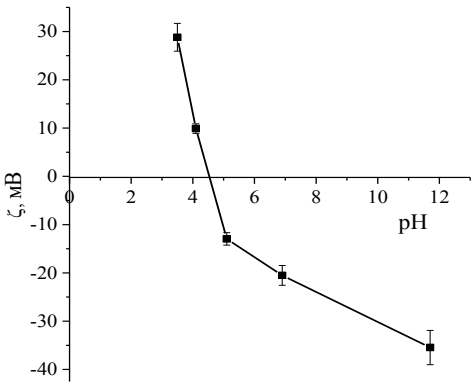


Рис. 5. Залежність електрокінетичного потенціалу (ζ) наночастинок золота від pH

Як видно, при зміні pH відбувається зміна заряду AuНЧ. Ізо-стану відповідає величина pH_{iso} = 4.45. Найбільший негативний зета-потенціал в лужній області склав –35.5 мВ при pH 11.7. Відповідно, в кислій області ζ = + 28.8 мВ. Тобто AuНЧ набували позитивний заряд при pH < 4.45. Встановлені показники, детерміновані методом синтезу

наночастинок з використанням цитрату натрію. Лимонна кислота, яка бере участь у відновлені і стабілізації AuНЧ є слабкою триосновною кислотою. Її карбоксильні групи визначають сумарний негативний заряд НЧ в нейтральному і лужному діапазоні pH.

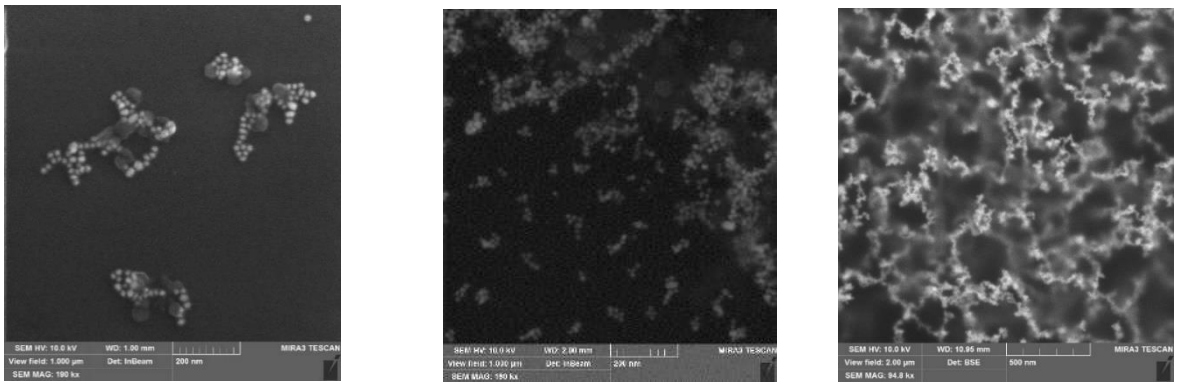
В таблиці 3 наведено залежність ζ-потенціалу AuНЧ від концентрації доданого сульфацетаміду натрію, а також pH розчину, в якому проводили вимірювання.

Таблиця 3. Залежність електрокінетичного потенціалу наночастинок золота від концентрації доданого сульфацетаміду натрію

Концентрація сульфацетаміду натрію, %	pH	ζ - потенціал, мВ
0	6.9	-20.5 ± 1.4
0	9.2	-26.2 ± 1.8
5	8.5	-29.9 ± 2.1
15	9.3	-37.8 ± 2.6
30	9.6	-41.4 ± 2.9

Як видно, всі розчини мали лужний pH. Негативний ζ-потенціал AuНЧ суттєво зростав із підвищенням концентрації САН, сягаючи значення – 41.5 мВ при концентрації 30 %. Підвищення негативного заряду із збільшенням основності розчинів є закономірним процесом, що підтверджують наведені на рис. 5 дані. Проте, порівнюючи величини ζ-потенціалу без САН і з ним при pH = 9.2–9.3 (другий і четвертий рядки таблиці 3), спостерігаємо різницю в 11.6 мВ. Така розбіжність може вказувати на те, що САН також вносить свій вклад в підвищення негативного заряду AuНЧ. Завдяки кислотним властивостям сульфамідної групи, молекули САН в лужних розчинах містять депротоновані аміногрупи і, відповідно, несуть негативний заряд. Тому можна очікувати електростатичного відштовхування іонізованих молекул САН від однойменно заряджених AuНЧ, а не збільшення величини негативного заряду, тобто існує додатковий механізм, який переважає, або частково компенсує електростатичну взаємодію (відштовхування) і визначає взаємодію сульфацетаміду натрію з AuНЧ. Наведені вище дані з вимірювання електрокінетичного потенціалу підтверджують припущення про хімічну взаємодію між золотом і САН.

На рис. 6 *а* наведено фото досліджених наночастинок золота одержані за методою сканувальної електронної мікроскопії. Додаткова обробка препаратів не проводилась. На фото видно сферичні практично монодисперсні наночастинки золота, серед яких переважають частинки розміром 20 нм.



а *б* *в*

Рис. 6. СЕМ зображення наночастинок золота (*а*) та системи наночастинок з доданим 0.1 % (*б*) і 5 % (*в*) сульфацетамідом натрію

Результати СЕМ візуалізації взаємодії розчину САН з AuНЧ для концентрацій сульфацетаміду 0.1 і 5 %, наведені відповідно на рис. 6 *б*, *в*. Аналіз зображень вказує на суттєву відмінність у структурі утворень. При малій концентрації наночастинки золота, вкриті тонкою оболонкою комплекса, утворювали флокули переважно з 4–7 одиниць. В той час, як при вмісті 5 % САН, утворилась структурована просторова сітка об'єднаних між собою AuНЧ, вкритих САН. Наночастинки утворювали переважно лінійні ланцюжки, на відміну від нативної дисперсії наночастинок. Також спостерігався дещо розмитий перехід між наночастинками і сульфацетамідом натрію, який його оточує. Такі результати добре корелюють з попередніми результатами спектроскопії, з яких витікає висновок про хімічну взаємодію між AuНЧ і САН. З урахуванням зробленого вище аналізу токсичного діапазону сульфацетаміду, концентрація 0.1 % відповідає переходу від нетоксичності до токсичної дії при збільшенні його концентрації.

ВИСНОВКИ

Дослідження цитотоксичності сульфацетаміду натрію на основі інтегрального показника – індексу метаболічної активності клітин МА-104 – дозволило встановити концентрації, які є базисом для пояснення імовірної токсичної дії матеріалів, імпрегнованих розчинами сульфацетаміду натрію. Індиферентною слід вважати концентрацію 0.05 % розчину сульфацетаміду натрію за умови 24 год контакту з клітинами і 0.1 % за умови 48 год контакту.

Спектральні дослідження суспензії наночастинок золота в розчинах сульфацетаміду натрію у діапазоні терапевтичних концентрацій 5.0÷30.0 % виявили немонотонний концентраційно-залежний вплив сульфаніламідного препарату на інтенсивність поглинання в видимому і ультрафіолетовому діапазонах. Встановлені зміни спектральних характеристик добре корелюють із впливом дослідженого препарату на електрокінетичний потенціал наночастинок золота, який підвищує їх негативний заряд. За даними сканувальної електронної мікроскопії взаємодія між компонентами сприяє структуруванню системи.

Одержані дані вказують на існування хімічної взаємодії між наночастинками золота і сульфацетамідом натрію в його розчинах, що дозволяє прогнозувати їхню поведінку при застосуванні у складі композитних матеріалів біомедичного призначення для зменшення токсичності і швидкості вимивання.

Робота була профінансована Національним фондом досліджень України в рамках конкурсу «Наука для безпеки і сталого розвитку України» за договором № 92/0178 від 01 травня 2023 р.

A study on the interaction of gold nanoparticles with sodium sulfacetamide

V.I. Podolska, L.S. Rieznichenko, L.M. Yakubenko, T.G. Gruzina, N.M. Zholobak, Yu.M. Samchenko, S.M. Dybkova

F.D. Ovcharenko Institute for Biocolloidal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
42 Acad. Vernadsky Blvd., Kyiv, 03680, Ukraine, vi.podolska@gmail.com
D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 04073, Ukraine

The present research is devoted to the investigation of a nanosystem including gold nanoparticles in an aqueous solution of sodium sulfacetamide in order to determine the nature and efficiency of their interaction depending on the concentration and pH of the medium. Sodium sulfacetamide is of interest due to the possibility of its use in the composition of new hydrogel materials with incorporated gold nanoparticles for the development of ophthalmic implants. Gold nanoparticles with an average size of 20 nm, obtained by hydrothermal synthesis, were used. The study of the cytotoxicity of sodium sulfacetamide based on the integral index of the metabolic activity of MA-104 cells established concentrations that are the basis for explaining the possible toxic effect of materials impregnated with sodium sulfacetamide solutions. The concentration of 0.1 % sodium sulfacetamide solution after 24 hours of contact

with cells and 0.05 % after 48 hours of contact should be considered as indifferent. The effectiveness of the interaction of sodium sulfacetamide and gold nanoparticles was evaluated by UV-Vis spectroscopy, electrokinetic measurements and scanning electron microscopy. Spectral studies of a suspension of gold nanoparticles in sodium sulfacetamide solutions in the range of therapeutic concentrations of 5.0÷30.0 % revealed a non-monotonic concentration-dependent effect of the sulfonamide medicine on the absorption intensity in the visible and ultraviolet ranges. The broadening of the spectral band of the surface plasmon resonance of gold nanoparticles in the presence of increasing concentrations of sulfacetamide and the appearance of an absorption band in the long-wave region were found. The peak shifts in the UV spectra after the addition of gold nanoparticles to sodium sulfacetamide were estimated. An increase in the negative value of the electrokinetic potential of gold nanoparticles under the influence of sulfacetamide from –26.2 mV to –41.4 mV was found. The data obtained indicate the existence of a chemical interaction between gold nanoparticles and sodium sulfacetamide solutions, which makes it possible to determine the conditions of their use in composite materials for biomedical purposes to reduce toxicity and leaching rate.

Keywords*: sodium sulfacetamide, albucid, cytotoxicity, gold nanoparticles, interaction, absorption spectra, electrokinetic potential*

ЛІТЕРАТУРА

1. *Van Rijt S., Habibovic P.* Enhancing regenerative approaches with nanoparticle // J. R. Soc. Interface. – 2017. – V. 14, N 129. – P. 20170093.
2. *Ko W.C., Wang S.J., Hsiao C.Y. et al.* Pharmacological role of functionalized gold nanoparticles in disease applications // Molecules. – 2022. – V. 27, N 5. – P. 1551.
3. *Vial S., Reis R.L., Oliveira J.M.* Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine // Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. – 2017. – V. 21, N 2. – P. 92–112.
4. *Sereemaspun A., Hongpiticharoen P., Royanathanes R. et al.* Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by metallic nanoparticles: a preliminary to nanogenomics // Int. J. Pharm. – 2008. – V. 4, N 6. – P. 492–495.
5. *Liu F., Wang L., Wang H. et al.* Modulating the activity of protein conjugated to gold nanoparticles by site-directed orientation and surface density of bound protein // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – V. 7, N 6. – P. 3717–3724.
6. *Rajakumari R., Tharayil A., Thomas S., Kalarikkal N*. Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications // Hybrid phosphor materials. Synthesis, characterization and applications. – Ed. IIUCNN, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India, 2022. – P. 275–301.
7. *Wekwejt M., Dziaduszewska M., Pałubicka A*. The problem of infections associated with implants – an overview // European Journal of Medical Technologies. – 2018. – V. 4, N 21. – P. 19–26.
8. *Ovung A., Bhattacharyya J*. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions // Biophys. Rev. – 2021. – V. 13, N 2. – P. 259–272.
9. *Azevedo-Barbosa H., Dias D.F., Franco L.L. et al*. From antibacterial to antitumour agents: a brief review on the chemical and medicinal aspects of sulfonamides // Mini-Rev. Med. Chem. – 2020. – V. 20, N 19. – P. 2052–2066.
10. *Ahmad l., Ahmad T., Usmanghani K.* Sulfacetamide // Analytical profiles of drug substances and excipients. – Academic Press, Inc., 1994. – V 23. – P. 471–509.
11. *da Silva G.R, Fialho S.L., Siqueira R.C. et al.* Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases // Braz. J. Pharm. Sci. – 2010. – V. 46, N 3. – P. 585–595.
12. *Vislohuzova T., Rozhnova R., Galatenko N.* Development and research of polyurethane foam composite materials with albucid // Am. J. Polym. Sci. Technol. – 2021. – V. 7, N 3. – P. 38–43.
13. *Samchenko Yu.M., Dybkova S.M., Maletskyy A.P. et al.* Antimicrobial effects of hydrogel implants incorporating gold nanoparticles and albucide and developed for reconstructive surgery in the orbit and periorbital area // Journal of Ophthalmology. – 2023. – V. 5, N 514. – P. 27–33.
14. *Carnovale C., Bryant G., Shukla R., Bansal V.* Identifying trends in gold nanoparticle toxicity and uptake: size, shape, capping ligand, and biological corona // ACS Omega. – 2019. – V. 4, N 1. – P. 242–256.
15. *García-Torra V., Cano A., Espina M. et al.* State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide nanoparticles and strategies to reduce toxicological risks // Toxics. – 2021. – V. 9, N 8. – P. 195.
16. *Chiba K., Kawakami K., Tohyama K*. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells // Toxicol. in Vitro. – 1998. – V. 12, N 3. – P. 251–258.
17. *Saotome K., Morita H., Umeda M.* Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs // Toxicol. in Vitro. – 1989. – V. 3, N 4. – P. 317–321.

18. *Turkevich J., Hillier J., Stevenson P.C.* A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // Discuss. Faraday Soc. – 1951. – V. 11. – P. 55–75.
19. *Soldatkin O.O., Soldatkina O.V., Piliponskiy I.I. et al.* Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors // Appl. Nanosci. – 2022. – V. 12. – P. 995–1003.
20. *Духин С.С., Дерягин Б.В.* Электрофорез. – Москва: Наука, 1976. – 328 с.
21. *Galatenko N.A., Kuliesh D.V., Narazhaiko L.F. et al.* Assessing *in vitro* cytotoxicity and pH of extracts of synthetic polymers made of cross-linked polyurethane composite with immobilized albucide // Journal of Ophthalmology. – 2020. – V. 4. – P. 56–61.
22. *Mohammadpour R., Safarian S., Sheibani N. et al.* Death inducing and cytoprotective autophagy in T-47D cells by two common antibacterial drugs: sulfathiazole and sulfacetamide // Cell Biol. Int. – 2013. – V. 37, N 4. – P. 348–358.
23. *Annur S., Santosa S.J., Aprilita H*. pH dependence of size control in gold nanoparticles synthesized at room temperature // Orient. J. Chem. – 2018. – V. 34, N 5. – P. 2305–2312.
24. *Різак Г.В.* Курс лекцій з фармацевтичної хімії: для студентів мед. ф-ту спец. “Фармація”. Кн. 2. – Ужгород: ФОП Сабов А.М. – 2022. – 284 с.
25. *Ahmed S., Anwar N., Sheraz M.A., Ahmad I.* Validation of a stability-indicating spectrometric method for the determination of sulfacetamide sodium in pure form and ophthalmic preparations // J. Pharm. Biol. Sci. – 2017. – V. 9. – P. 26–34.
26. *Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.* Применение УФ-спектроскопии для изучения диффузии лекарственных соединений из гидрогелей медицинского назначения // Журнал хроматографічного товариства. – 2010. – Т. 10, № 1–4. – С. 21–29.
27. *Buglak A.A., Kononov A.I.* Comparative study of gold and silver interactions with amino acids and nucleobases // RSC Adv. – 2020. – V. 10. – P. 34149.
28. *Perea C.G., Restrepo O.J.* Use of amino acids for gold dissolution // Hydrometallurgy. – 2018. – V. 177. – P. 79–85.
29. *Eksteen J.J., Oraby E.A.* The leaching and adsorption of gold using low concentration amino acids and hydrogen peroxide: Effect of catalytic ions, sulfide minerals and amino acid type // Miner. Eng. – 2015. – V. 70. – P. 36–42.
30. *Clogston J.D., Patri A.K.* Zeta potential measurement // Chapter 6. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, methods in molecular biology. – (Scott E. McNeil (ed.)), V. 697. – Springer Science and Business Media LLC, 2011. – P. 63.

REFERENCES

1. Van Rijt S., Habibovic P. Enhancing regenerative approaches with nanoparticle. *J. R. Soc. Interface*. 2017. **14**(129)*:* 20170093.
2. Ko W.C., Wang S.J., Hsiao C.Y., Hung C.T., Hsu Y.J., Chang D.C., Hung C.F. Pharmacological role of functionalized gold nanoparticles in disease applications. *Molecules*. 2022. **27**(5): 1551.
3. Vial S., Reis R.L., Oliveira J.M. Recent advances using gold nanoparticles as a promising multimodal tool for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2017. **21**(2): 92.
4. Sereemaspun A., Hongpiticharoen P., Royanathanes R., Maneewattanapinyo P., Ekgasit S., Warisnoicharoen W. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by metallic nanoparticles: a preliminary to nanogenomics. *Int. J. Pharm.* 2008. **4**(6): 492.
5. Liu F., Wang L., Wang H., Yuan L., Li J., Brash J.L., Chen H. Modulating the activity of protein conjugated to gold nanoparticles by site-directed orientation and surface density of bound protein. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. **7**(6): 3717.
6. Rajakumari R., Tharayil A., Thomas S., Kalarikkal N. Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications. In: *Hybrid Phosphor Materials. Synthesis, Characterization and Applications*. (Ed. IIUCNN, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India, 2022).
7. Wekwejt M., Dziaduszewska M., Pałubicka A. The problem of infections associated with implants – an overview. *European Journal of Medical Technologies*. 2018. **4**(21): 19.
8. Ovung A., Bhattacharyya J. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophys. Rev*. 2021. **13**(2): 259.
9. Azevedo-Barbosa H., Dias D.F., Franco L.L., Hawkes J.A., Carvalho D.T. From antibacterial to antitumour agents: a brief review on the chemical and medicinal aspects of sulfonamides. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2020. **20**(19): 2052.

10. Ahmad l., Ahmad T., Usmanghani K. Sulfacetamide. In: *Analytical profiles of drug substances and excipients.* (Academic Press, Inc., 1994).
11. da Silva G.R, Fialho S.L., Siqueira R.C., Jorge R., Cunha Júnior A.S. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010. **46**(3): 585.
12. Vislohuzova T., Rozhnova R., Galatenko N. Development and research of polyurethane foam composite materials with albucid. *Am. J. Polym. Sci. Technol*. 2021. **7**(3): 38.
13. Samchenko Yu.M., Dybkova S.M., Maletskyy A.P., Kernosenko L.O., Gruzina T.G., Pasmurtseva N.O., Rieznichenko L.S., Poltoratska T.P., Liutko O.B., Vitrak K.V., Bigun N.M., Vorotytskyi P.V., Mamyshev I.Ie. Antimicrobial effects of hydrogel implants incorporating gold nanoparticles and albucide and developed for reconstructive surgery in the orbit and periorbital area. *Journal of Ophthalmology*. 2023. **5**(514): 27.
14. Carnovale C., Bryant G., Shukla R., Bansal V. Identifying trends in gold nanoparticle toxicity and uptake: size, shape, capping ligand, and biological corona. *ACS Omega*. 2019. **4**(1): 242.
15. García-Torra V., Cano A., Espina M., Ettcheto M., Camins A., Barroso E., Vazquez-Carrera M., García M.L., Sánchez-López E., Souto E.B. State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide nanoparticles and strategies to reduce toxicological risks. *Toxics*. 2021. **9**(8): 195.
16. Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. in Vitro*. 1998. **12**(3): 251.
17. Saotome K., Morita H., Umeda M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicol. in Vitro*. 1989. **3**(4): 317.
18. Turkevich J., Hillier J., Stevenson P.C. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 1951. **11**: 55.
19. Soldatkin O.O., Soldatkina O.V., Piliponskiy I.I., Rieznichenko L.S., Gruzina T.G., Dybkova S.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Application of gold nanoparticles for improvement of analytical characteristics of conductometric enzyme biosensors. *Appl. Nanosci*. 2022. **12**: 995.
20. Dukhin S.S., Deriagin B.V. *Electrophoresis*. (Moscow: Nauka, 1976). [in Russian].
21. Galatenko N.A., Kuliesh D.V., Narazhaiko L.F., Zakashun T.Iu., Maletskyy A.P., Bigun N.M. Assessing in vitro cytotoxicity and pH of extracts of synthetic polymers made of cross-linked polyurethane composite with immobilized albucide. *Journal of Ophthalmology*. 2020. **4**: 56.
22. Mohammadpour R., Safarian S., Sheibani N., Norouzi S., Razazan A. Death inducing and cytoprotective autophagy in T-47D cells by two common antibacterial drugs: sulfathiazole and sulfacetamide. *Cell Biol. Int*. 2013. **37**(4): 348.
23. Annur S., Santosa S.J., Aprilita H. pH dependence of size control in gold nanoparticles synthesized at room temperature. *Orient. J. Chem*. 2018. **34**(5): 2305.
24. Rizak H.V. *Course of lectures on pharmaceutical chemistry: for medical students by pharmacy specialty*. Book 2. (Uzhhorod: FOP Sabov A.M., 2022). [in Ukrainian].
25. Ahmed S., Anwar N., Sheraz M.A., Ahmad I. Validation of a stability-indicating spectrometric method for the determination of *sulfacetamide* sodium in pure form and ophthalmic preparations. *J. Pharm. Biol. Sci*. 2017. **9**: 26.
26. Samchenko Yu.M., Pasmurtseva N.O., Ulberg Z.R. Application of UV spectroscopy to study the diffusion of drug compounds from medical hydrogels. *Zurnal Hromatograficnogo tovaristva*. 2010. **10**(1–4): 21. [in Russian].
27. Buglak A.A., Kononov A.I. Comparative study of gold and silver interactions with amino acids and nucleobases. *RSC Adv*. 2020. **10**: 34149.
28. Perea C.G., Restrepo O.J. Use of amino acids for gold dissolution. *Hydrometallurgy.* 2018. **177**: 79.
29. Eksteen J.J., Oraby E.A. The leaching and adsorption of gold using low concentration amino acids and hydrogen peroxide: Effect of catalytic ions, sulfide minerals and amino acid type. *Minerals Engineering*. 2015. **70**: 36.
30. Clogston J.D., Patri A.K. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery, methods in molecular biology. In: *Zeta potential measurement*. (Springer Science and Business Media LLC, 2011).

Надійшла 15.02.2024, прийнята 03.09.2024