

УДК 577

**АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ,  
СОДЕРЖАЩИХ ИОННОЕ СЕРЕБРО ИЛИ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА**

***Е.В. Владимирова<sup>1</sup>, Д.С. Орлов<sup>2</sup>, Н.Ю. Ульянова<sup>3</sup>, О.Б. Иванченко<sup>1</sup>***

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт Химии силикатов им. А.В. Гребенщикова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность: Успешное внедрение антибиотиков и их широкое применение привело к появлению устойчивых штаммов микроорганизмов, что толкает исследователей на поиск антибиотиков принципиально нового механизма действия [1]. Различные формы серебра рассматриваются в качестве перспективных препаратов для борьбы с антибиотикорезистентными патогенами [2]. Антимикробные свойства серебра известны человечеству с древних времен. Серебро в различных формах все более широко применяется в качестве эффективных антибактериальных и противогрибковых средств в перевязочных материалах и раневых покрытиях, медицинской технике, в водных фильтрах. Соли серебра использовали для лечения психических заболеваний, эпилепсии, никотиновой зависимости, гастроэнтерита, стоматита и заболеваний, передаваемых половым путем, (сифилис, гонорея и др.) [3, 4].

Механизмы микробицидного действия как ионных форм серебра, так и его наночастиц, остаются, тем не менее, не до конца изученными. Предполагают, что ионы серебра способны связываться с тиоловыми группами различных бактериальных ферментов и белков, нарушая их функции, подавляют деление клетки, вызывают морфологические изменения, взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, а именно с основаниями ДНК [5]. Основной мишенью действия наночастиц предположительно являются мембраны бактерии. Сорбция на них происходит благодаря электростатическим взаимодействиям [3]. Некоторые считают, что наносеребро нарушает работу дыхательной цепи, что может приводить к генерации активных форм кислорода; нарушением электрохимического градиента [3, 6]. Показана зависимость антимикробной активности наночастиц от их формы и размера. Более мелкие обладают большей цитотоксичностью, при этом они обнаруживаются в значительных количествах и во внутриклеточных компартментах. [6, 7].

Однако показана токсичность обеих форм серебра и по отношению к эукариотическим клеткам. Токсичность наночастиц связывают с выделением ионных форм серебра. Тем не менее, показано, что наночастицы обладают собственной, отличной от ионов токсичностью. При действии наносеребра на эукариотическую клетку наблюдается ее сморщивание, угнетение дыхательной активности митохондрий, снижение содержания АТФ и связанное с этим нарушение репарации ДНК.

Отмечено, что действие ионов серебра не сопровождается подобным эффектом в отношении митохондрий. Токсичность наночастиц, как и антибактериальная активность, возрастает с уменьшением их размеров [7]. Показано, что они способны запускать клеточную гибель по пути апоптоза [8].

Крайне важно добиться того, чтобы антимикробные препараты наряду с бактерицидным действием оказывали как можно менее выраженный токсический эффект на клетки человека. На данный момент нет единого мнения по поводу наименее токсичной для человека формы серебра. В связи с этим актуальной представляется оценка цитотоксического действия серебра в различных формах на клетки человека и его сравнение с показателем антимикробной активности.

Целью настоящей работы является сравнение антимикробной и цитотоксической активности препаратов, содержащих ионное серебро и наночастицы серебра.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы наноматериалов, изготовленных на основе природных силикатов, содержащих серебро в форме ионов либо наночастиц в сходных концентрациях. Наночастицы серебра были получены путем химического восстановления с использованием нитрата серебра. Размер частиц составлял около 20 нм. Провели сравнительное изучение антимикробной и гемолитической активности двух образцов:

- образец № 1, содержащий ионное серебро;
- образец № 2, содержащий наночастицы серебра.

Антимикробную активность образцов определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы [9].

Оценка антимикробной активности проводилась в отношении грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* 1399/17, а также в отношении грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 522/17 MDR, *Klebsiella pneumoniae* ESBL 344/ (микроорганизмы были любезно предоставлены сотрудниками Института эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера) и *Escherichia coli* ML-35 (предоставлена профессором Р. Лерером (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США)).

В эксперименте использовали культуры бактерий в логарифмической фазе роста с концентрацией  $1 \times 10^5$  колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл. Бактерии выращивали в 2,1 % бульоне Мюллера-Хинтона M391 (HiMedia, Индия).

Двукратные серийные разведения исследуемых образцов проводили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина и вносили по 5 мкл в лунки стерильной микрокамеры Теракаки. В эти же лунки вносили эквивалентное количество бактериальной суспензии. В качестве контролей служили: контроль стерильности среды и контроль жизнеспособности бактерий. Микрокамеры инкубировали при температуре 37 °С в течение 16–20 часов.

За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наибольшую концентрацию вещества, при которой не наблюдали рост микроорганизмов в соответствующих лунках микрокамеры.

Для определения возможности исследуемых образцов повреждать мембраны эукариотических клеток использовали гемолитический тест [9]. Для определения гемолитической активности использовали эритроциты человека. К 90 мкл 2,8 %-ной суспензии эритроцитов в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) добавляли 10 мкл анализируемого образца, серийные разведения которого готовили в 0,01 % уксусной кислоте. После добавления образцов получали 2,5 %-ные суспензии эритроцитов.

Для получения положительного контроля (100 % лизис эритроцитов) к 90 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мкл детергента Triton X-100, разведенного в 10 раз в водном растворе 0,01 % уксусной кислоты. Для получения негативного контроля (0 % лизис эритроцитов) к 90 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мкл 0,01 % уксусной кислоты.

Анализируемые растворы (по 3 параллели для каждой из исследуемых проб) инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 150 мкл охлажденного ЗФР. Затем пробы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 4 мин. Отбирали 200 мкл супернатанта и вносили в ячейки 96-луночного планшета (Costar, Corning Inc.).

Измерение оптической плотности проб производили на планшетном спектрофотометре SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, США) при длине волны 540 нм. По оптической плотности судили о содержании в супернатанте гемоглобина, вышедшего из разрушенных эритроцитов.

Процент гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Гемолиз (\%)} = \frac{\text{OD}_{540}(\text{образца}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})}{\text{OD}_{540}(100\% \text{ лизис}) - \text{OD}_{540}(0\% \text{ лизис})} \times 100\%$$

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определены минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации исследуемых образцов в отношении различных бактерий, результаты представлены в таблице 1 как выборочные медианы, рассчитанные по данным серии 3–4 независимых экспериментов по 3 параллели проб в каждом.

Таблица 1 Минимальные ингибирующие рост микроорганизмов концентрации исследуемых образцов

Бактерии	МИК, мг/мл	
	Образец № 1	Образец № 2
E.coli ML-35 p	0,03125	0,125
P. aeruginosa 522/17 MDR	0,03125	0,125
K.pneumoniae ESBL 344/1	0,03125	0,25
S. aureus 1399/17	0,03125	0,5

Из таблицы 1 видно, что оба образца обладают антимикробной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, но микроорганизмы более чувствительны к ионному серебру, чем к наночастицам серебра.

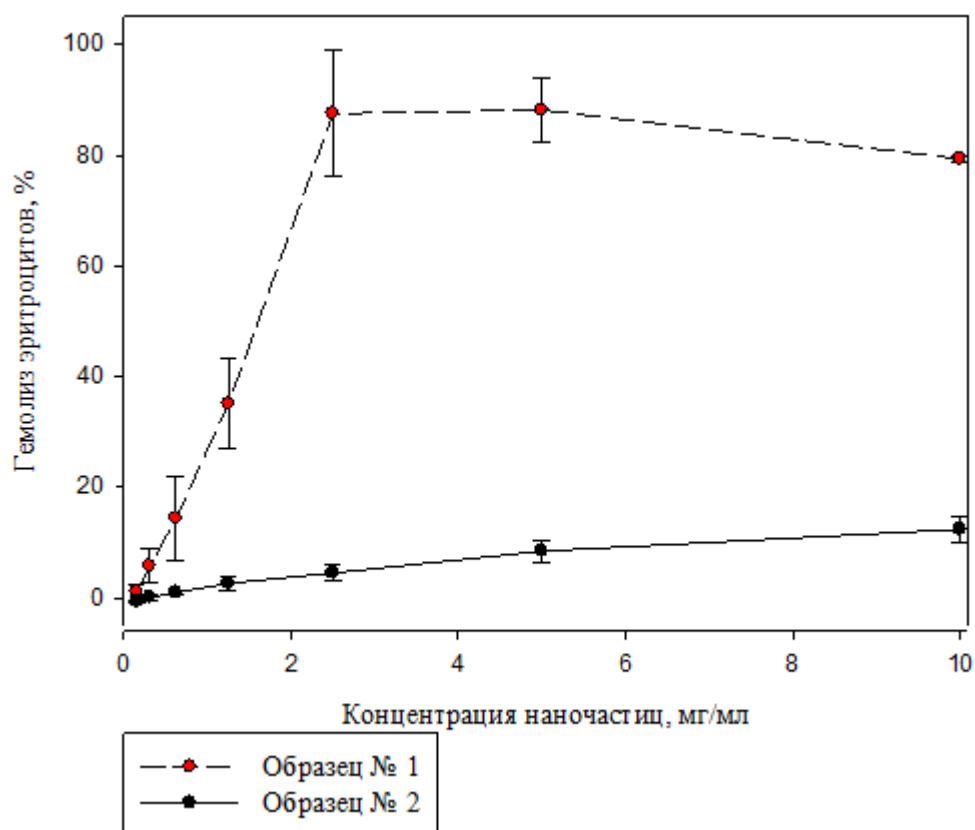


Рис. 1. Гемолитическая активность исследуемых образцов

Однако, кроме наличия антимикробной активности, необходимо отсутствие токсичности по отношению к клеткам человека. Гемолитический тест позволяет провести первичную оценку токсичности препаратов для эукариотических клеток. Процент гемолиза оценивали по данным трех независимых экспериментов, в каждом из которых имелось по три параллели исследуемых проб. Исходя из результатов гемолитического теста, представленных на рисунке 1, видно, что образец с ионным серебром вызывает гемолиз эритроцитов, в то время как образец с наночастицами серебра такой активностью в диапазоне исследуемых концентраций не обладает. Таким образом, получены новые данные, подтверждающие концепцию о преимуществах практического применения антимикробных препаратов на основе наночастиц серебра по сравнению с препаратами, содержащими ионное серебро.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lewies A., Du Plessis L.H., Wentzel J.F. Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? // *Probiotics and antimicrobial proteins*. – 2019. – V. 11, №. 2. – P. 370–381.
2. Rai M.K. et al. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria // *Journal of applied microbiology*. – 2012. – V. 112, № 5. – P.841–52.
3. Lara H.H. et al. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds // *Journal of nanobiotechnology*. – 2011. – V.9. – E.30.
4. Kim J.S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2007. – V.3. – P. 95–101.
5. Jung W.K. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74, №. 7. – P. 2171–2178.
6. Durán N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2010. – V.21, № 6. – P.949–959.
7. Durek A. et al. New antibacterial therapeutics and strategies // *Pol J Microbiol.* 2011. V. 60, № 1. P.3–12.
8. Park E.J. et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism // *Toxicology in vitro*. – 2010. – V. 24, № 23, – P. 872–878.
9. Shafer W.M. (ed.). *Antibacterial peptide protocols*. – Humana Press, 1997. – V. 78. – 255 p.