УДК 544.02; 579.61; 615.31; 615.46 DOI: 10.15372/SSMJ20180404

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕИНАТА СЕРЕБРА

Василий Александрович БУРМИСТРОВ[1], Владимир Иванович ЗАЙКОВСКИЙ[2], Антон Васильевич БУРМИСТРОВ[3], Любовь Никифоровна РАЧКОВСКАЯ[3], Анна Вениаминовна ШУРЛЫГИНА[3], Татьяна Викторовна ПОПОВА[3], Маргарита Владимировна РОБИНСОН[3], Максим Александрович КОРОЛЕВ[3], Андрей Юрьевич ЛЕТЯГИН[3]

[1] *Научно-производственный центр «Вектор-Вита»*
630098, г. Новосибирск, ул. Приморская, 33-212

[2] *Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН*
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5

[3] *НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН*
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Целью данной работы являлось сравнительное исследование размеров частиц коммерческих препаратов коллоидного серебра методом электронной микроскопии в связи с характеристикой специфической антимикробной активности препаратов в одинаковых условиях. Исследовали четыре коммерческих препарата коллоидного серебра: Витаргол Форте (производство НПЦ «Элюсан»), Проталор (производство ООО «Эско-Фарм», Армения), Сиалор (производство ПФК «Обновление») и, в качестве препарата сравнения, Протаргол (рецептурный аптечный препарат). **Материал и методы.** Размеры частиц серебра в препаратах определялись с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения на электронном микроскопе JEM 2010 (JEOL, Япония) с разрешением по решетке 0,14 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изучение антимикробной активности препаратов протеината серебра проводили стандартным методом серийных разведений на жидких питательных средах и методом диффузии с использованием бактериальных культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. **Результаты и их обсуждение.** Наиболее мелкодисперсным и монодисперсным является препарат Витаргол Форте, изготавливаемый по усовершенствованной технологии. Наиболее грубодисперсным и полидисперсным был препарат стандартного классического Протаргола, приготовленный в аптечных условиях. **Заключение.** Показана зависимость антимикробной активности препарата от размера частиц серебра в нем. Из четырех исследованных препаратов протеината серебра наименьший размер частиц был в Витарголе Форте. Этот же препарат продемонстрировал наиболее высокую бактерицидную и бактериостатическую активность.

Ключевые слова: коллоидное серебро, протеинат серебра, размеры частиц, бактерицидное действие, бактериостатическое действие.

Бурмистров В.А. *– к.х.н., директор, e-mail: vector-vita@ngs.ru*
Зайковский В.И. *– к.х.н., старший научный сотрудник, e-mail: viz@catalysis.ru*
Бурмистров А.В. *– зам. директора, e-mail: vector-vita@mail.ru*
Рачковская Л.Н. *– к.х.н., зав. лабораторией, e-mail: noolit@niikel.ru*
Шурлыгина А.В. *– д.м.н., проф., ведущий научный сотруник, e-mail: anna_v_s@mail.ru*
Попова Т.В. *– младший научный сотрудник, e-mail: noolit@niikel.ru*
Робинсон М.В. *– старший научный сотрудник, e-mail: mil777@ngs.ru*
Королев М.А. *– к.м.н., зав. лабораторией, e-mail: kormax@bk.ru*
Летягин А.Ю. *– д.м.н., проф., руководитель НИИКЭЛ – филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru*

Важнейшей проблемой медицины и клинической практики является разработка новых и эффективных методов лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам. Ее решению способствуют разработки эффективных противомикробных препаратов с использованием наночастиц серебра, обладающих широким спектром антимикробных свойств. В литературе имеются данные, которые убедительно показывают, что наночастицы серебра способны уничтожать патогенные бактерии, резистентные к антибиотикам *in vivo* и *in vitro* [4]. Препараты коллоидного серебра рассматриваются как перспективные средства для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, включая острые респираторно-вирусные инфекции и лор-заболевания [1, 5]. В настоящее время появился ряд новых препаратов коллоидного серебра и его разновидности – кластерного серебра (с меньшим размером частиц серебра) [3]. Целью данной работы являлось сравнительное исследование размеров частиц коммерческих препаратов коллоидного серебра методом электронной микроскопии в сопоставлении со специфической антимикробной активностью этих препаратов в одинаковых условиях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали четыре коммерческих препарата коллоидного серебра: Витаргол Форте (производство НПЦ «Элюсан»), Проталор (производство ООО «Эско-Фарм», Армения), Сиалор (производство ПФК «Обновление») и, в качестве препарата сравнения, Протаргол (рецептурный аптечный препарат).

Размеры частиц серебра в препаратах определяли методом электронной микроскопии. Перед исследованием все образцы дополнительно разбавляли дистиллированной водой в 50 раз и обрабатывали ультразвуком с частотой 35 кГц и плотностью излучения до 1 Вт/см^2 с целью диспергирования агрегатов частиц серебра. Полученные водные растворы серебра помещали на перфорированные углеродные пленки, закрепленные на медных сетках, и после высушивания при комнатной температуре исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения на электронном микроскопе JEM 2010 (JEOL, Япония) с разрешением по решетке 0,14 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Антимикробную активность препаратов протеината серебра изучали стандартным методом серийных разведений на жидких питательных средах и методом диффузии. Методики отработаны с учетом стандартных рекомендаций в соответствии с Методическими указаниями [2]. Исследование методом серийных разведений проводили с использованием бактериальных культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* путем подсчета количества жизнеспособных бактерий в 1 мл культуры (КОЕ/мл) при культивировании тест-штамма на жидкой питательной среде в присутствии определенного разведения исследуемого препарата. В качестве контроля использовали суспензию тест-штамма без препарата. Суспензии бактериальных культур с концентрацией 10^5–10^6 КОЕ/мл получали разведением свежеприготовленной «ночной» культуры в L-бульоне. В пробирки с 10 мл суспензии бактерий добавляли препарат из расчета получения разведения 1/10, 1/50, 1/200, 1/1000 (соответственно по 100/20/5/1 мкл/мл) и инкубировали на качалке (180 оборотов в мин) при 37 °С. Пробы суспензии отбирали через 4 и 24 ч от начала культивирования. Для подсчета концентрации жизнеспособных бактерий (КОЕ) делали десятикратные разведения отобранных проб на физиологическом растворе и высевали на чашки Петри с рыбным питательный агаром, которые инкубировали в термостате при 37 °С. Через 20 ч культивирования подсчитывали число выросших колоний и рассчитывали концентрацию жизнеспособных бактерий в КОЕ/мл суспензии. Все эксперименты выполняли в двух повторах, результаты усредняли.

Определение антимикробной активности препаратов методом диффузии в агаре выполнили на тест-штамме *P. aeruginosa*. Суспензию клеток суточной культуры тест-штамма в количестве $1{,}0 \times 10^7$ КОЕ с использованием верхнего агара равномерно наносили на чашки Петри с агаризованной средой (РПА). В полученном «газоне» делали лунки диаметром 6 мм и вносили в них по 50 мкл разведений препаратов, которые готовили на дистиллированной воде: A) разведение в 10 раз; B) разведение в 50 раз; C) разведение в 200 раз; D) разведение в 1000 раз. Для каждого образца использовали две параллельные лунки. Через сутки культивирования учитывали результаты (наличие зон угнетения роста бактерий).

При проведении статистической обработки результатов исследования вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (SD) и представляли в виде $M \pm SD$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типичные электронно-микроскопические снимки изученных препаратов серебра представлены на рис. 1, гистограммы распределения частиц серебра по размерам в препаратах – на рис. 2, количественные показатели гистограмм обобщены в табл. 1. Как видно из представленных данных, наиболее мелкодисперсным и монодисперсным является препарат Витаргол Форте. Средний размер частиц серебра в нем в 1,5–2 раза меньше, чем в других препаратах. Наиболее грубодисперсным и полидисперсным был препарат стандартного классического Протаргола, приготовленный в аптечных условиях.

Результаты тестирования антимикробной активности препаратов представлены в табл. 2 и 3. Отсутствие роста бактерий, т.е. бактерицидное действие – 0; снижение титра по сравнению с контролем более чем в 3 раза означает бактериостатическое действие, угнетение роста бактерий. При тестировании диффузионным методом Проталор и стандартный Протаргол какого-либо значимого антимикробного действия не проявили, образования зон угнетения роста не отмечалось. Препарат Сиалор оказывал небольшое антимикробное воздействие лишь при разведении 1/10, размер зоны угнетения роста тест-штамма составил примерно 8 мм. Витаргол Форте из изученных препаратов был наиболее активным, оказывал антимикробное действие при разведениях 1/10 и 1/50, размер зон угнетения составил соответственно 11 и 8 мм. На рис. 3 приведены фотографии чашек Петри с «газоном» тест-штамма и лунками с тестируемыми препаратами Сиалор и Витаргол Форте.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная методика тестирования методом серийных разведений на жидких питательных средах с отбором проб через 4 и 24 ч позволяет количественно оценивать бактерицидную и бактериостатическую составляющие активности и дает представление о динамике процесса (скоростях роста и гибели бактерий).

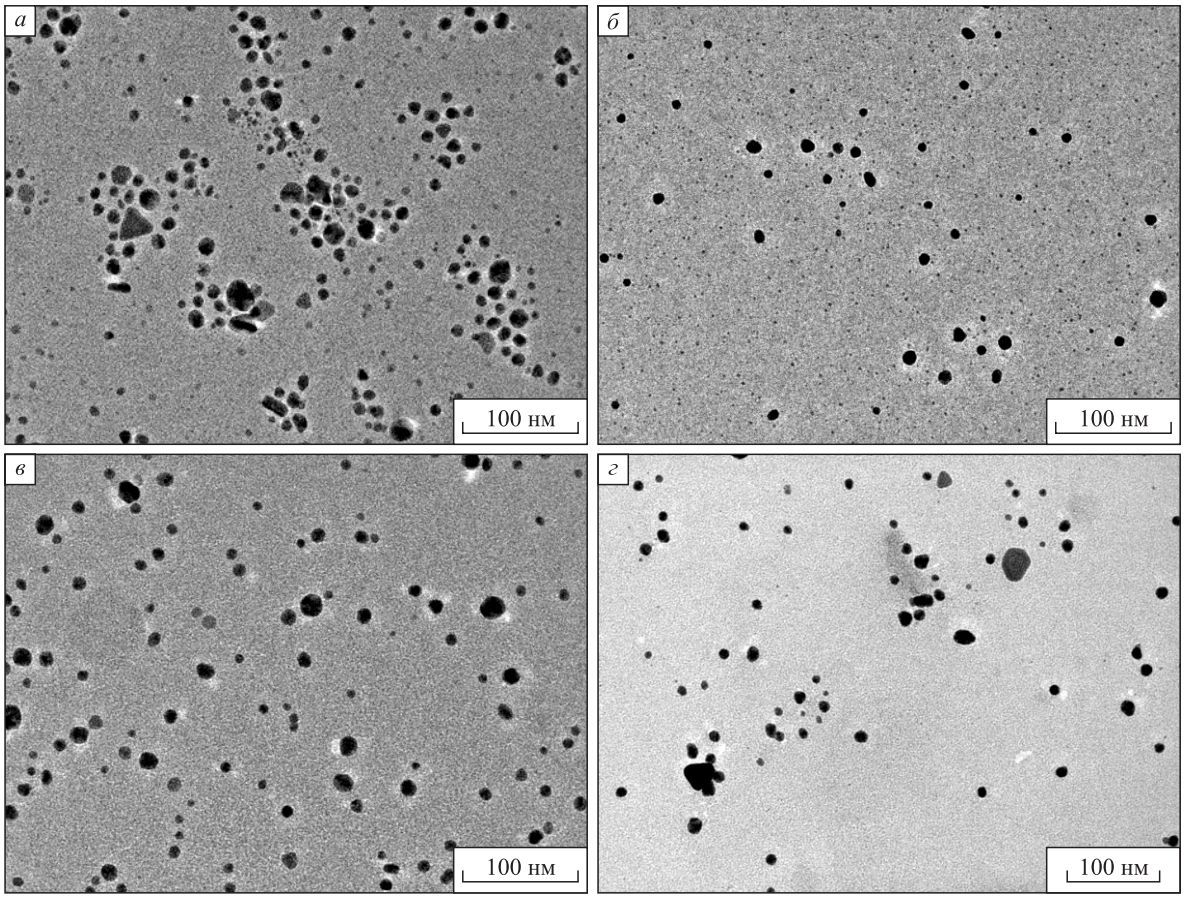

Рис. 1. *Типичные электронно-микроскопические снимки образцов препаратов Сиалор (а), Витаргол Форте (б), Проталор (в) и Протаргол (г). Просвечивающая электронная микроскопия высокого разрешения, электронный микроскоп JEM 2010 (JEOL, Япония) с разрешением по решетке 0,14 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ*

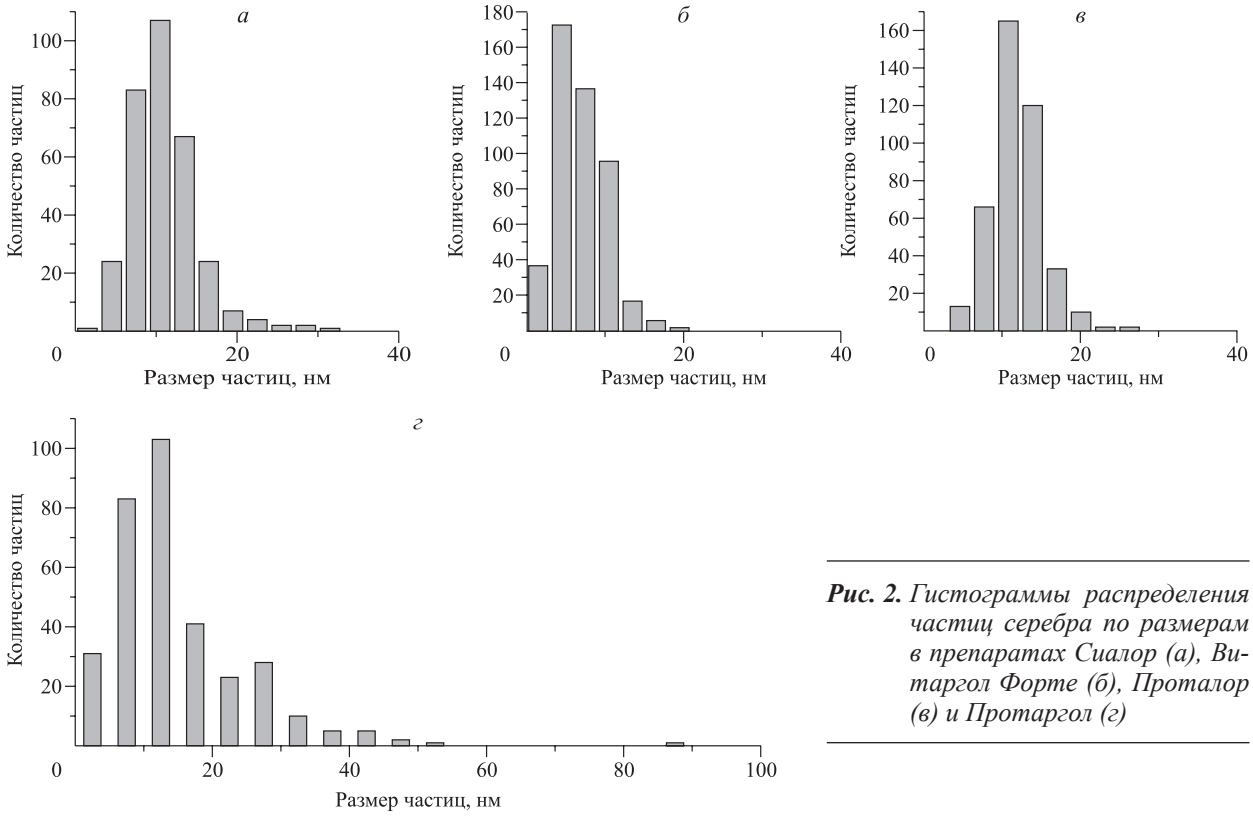

Рис. 2. *Гистограммы распределения частиц серебра по размерам в препаратах Сиалор (а), Витаргол Форте (б), Проталор (в) и Протаргол (г)*

Таблица 1

Размер частиц в препаратах

Препарат	Размер, нм	Выборка (количество частиц)
Сиалор	11,0 ± 4,1*#	322
Витаргол Форте	6,8 ± 3,1#	468
Проталор	11,5 ± 3,3*#	411
Протаргол	14,9 ± 10,1*	333

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – Витаргола Форте, # – Протаргола.

Из представленных в табл. 2 и 3 результатов следует, что бактерии различаются по своей чувствительности к действию препаратов серебра: тест-штамм *St. aureus* более устойчив к действию препаратов серебра по сравнению с *E. coli*.

Препараты серебра значительно различаются между собой по антимикробной активности. Наименее активными были Проталор и стандартный Протаргол. Бактерицидного действия в использованных условиях тестирования они не

Таблица 2

Бактерицидная и бактериостатическая активность препаратов в отношении тест-штамма St. aureus

Препарат	Концентрация бактерий при разведении препарата через 4 и 24 ч культивирования, КОЕ/мл						
	1/10		1/50		1/200		1/1000
	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч	24 ч
Сиалор	0	0	$2,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
Витаргол Форте	0	0	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
Проталор	$1,5 \times 10^3$	$8,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
Протаргол	$6,4 \times 10^2$	$7,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$

Примечание. Исходная посевная концентрация бактерий $1,3 \times 10^5$ КОЕ/мл, контроль через 4 и 24 ч культивирования – соответственно $3,6 \times 10^6$ и $1,6 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Таблица 3

Бактерицидная и бактериостатическая активность препаратов в отношении тест-штамма E. coli

Препарат	Концентрация бактерий при разведении препарата через 4 и 24 ч культивирования, КОЕ/мл						
	1/10		1/50		1/200		1/1000
	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч	24 ч
Сиалор	0	0	$1,1 \times 10^5$	0	$6,7 \times 10^4$	$4,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$
Витаргол Форте	0	0	$1,4 \times 10^4$	0	$3,7 \times 10^4$	0	$2,3 \times 10^9$
Проталор	$5,2 \times 10^3$	$5,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$7,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
Протаргол	$3,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^4$	1.3×10^5	$5,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$

Примечание. Исходная посевная концентрация бактерий $4,0 \times 10^5$ КОЕ/мл, контроль через 4 и 24 ч культивирования – соответственно $2,7 \times 10^6$ и $1,8 \times 10^9$ КОЕ/мл.

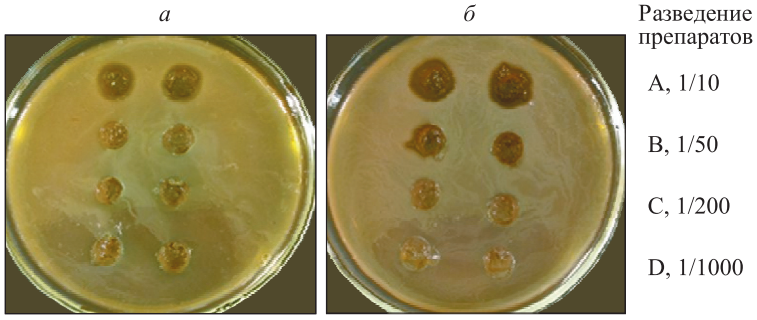

Рис. 3. *Фотографии чашек Петри с тестируемыми препаратами Сиалор (а), Витаргол Форте (б)*

оказывали, проявляли сильное бактериостатическое действие в разведении 1/10 (снижение титров на 3–4 порядка на тест-штамме *E. coli*, до 3 порядков на тест-штамме *St. aureus*). В разведении 1/50 эти препараты снижали титры *E. coli* на 1–1,5 порядка. Более активным был Сиалор. В разведении 1/10 он проявлял бактерицидное действие на обоих штаммах, в разведении 1/50 оказывал бактерицидное действие на *E. coli* через 24 ч культивирования и бактериостатическое действие при 4 ч культивирования, в разведении 1/200 – бактериостатическое действие на *E. coli* при 4 ч культивирования.

Наибольшую антимикробную активность из четырех изученных препаратов проявил Витаргол Форте. В разведении 1/10 он оказывал бактерицидное действие на обоих штаммах, в разведении 1/50 и 1/200 – бактерицидное действие на *E. coli* через 24 ч культивирования и бактериостатическое действие при 4 ч культивирования. В разведении 1/50 оказывал сильное бактериостатическое действие (снижение титров на 1–3 порядка) на тест-штамм *St. aureus*. По результатам тестирования диффузионным методом препарат Витаргол Форте также проявил наиболее высокую антимикробную активность в отношении тест-штамма *P. aeruginosa*.

При одинаковой концентрации серебра увеличение удельной (на единицу серебра) антимикробной активности может быть связано с меньшим размером частиц серебра в препарате. По данным электронной микроскопии, средний размер частиц серебра в Витарголе в 1,5–2 раза меньше, чем в других препаратах (см. табл. 1). Это ведет к увеличению суммарной площади поверхности всех частиц серебра или, иными словами, суммарной площади взаимодействия серебра с бактериями, что положительно сказывается на активности препарата. Уменьшение наблюдаемого линейного размера в 1,5–2 раза означает, что средний объем или средняя масса одной частицы серебра в препарате уменьшается не менее чем в 4–8 раз (1,5–2 в третьей степени). Это повышает агрегационную устойчивость препарата, а также облегчает диффузию наночастиц серебра в агар, что подтверждается при тестировании активности диффузионным методом. В целом все это обусловливает более высокую активность и стабильность Витаргола по сравнению с другими протеинатами серебра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана зависимость антимикробной активности препарата от размера частиц серебра в нем. Из четырех исследованных препаратов протеината серебра наименьший размер частиц был в Витарголе Форте. Этот же препарат продемонстрировал наиболее высокую антимикробную активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Благитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П.* Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр, 2004. 254 с.

2. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.

3. *Рачковская Л.Н., Летягин А.Ю., Бурмистров В.А., Королев М.А., Гельфонд Н.Е., Бородин Ю.И., Коненков В.И.* Модифицированные сорбенты для практического здравоохранения // Сиб. науч. мед. журн. 2015. 35. (2). 47–54.

4. *Escárcega-González C.E., Garza-Cervantes J.A., Vázquez-Rodríguez A., Montelongo-Peralta L.Z., Treviño-González M.T., Díaz Barriga Castro E., Saucedo-Salazar E.M., Chávez Morales R.M., Regalado Soto D.I., Treviño González F.M., Carrazco Rosales J.L., Cruz R.V., Morones-Ramírez J.R. In vivo* antimicrobial activity of silver nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Acacia rigidula* as a reducing and capping agent // Int. J. Nanomedicine. 2018. 13. 2349–2363.

5. *Epstein N.E.* Do silver-impregnated dressings limit infections after lumbar laminectomy with instrumented fusion? // Surg. Neurol. 2007. 68. (5). 483–485.

COMPARATIVE ELECTRON-MICROSCOPIC AND MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF SILVER PROTEINATE PREPARATIONS

Vasiliy Aleksanrovich BURMISTROV[2], Vladimir Ivanovich ZAYKOVSKIY[3], Anton Vasil'evich BURMISTROV[2], Lyubov' Nikiforovna RACHKOVSKAYA[1], Anna Veniaminovna SHURLYGINA[1], Tat'yana Viktorovna POPOVA[1], Margarita Vladimirovna ROBINSON[1], Maksim Aleksandrovich KOROLEV[1], Andrey Yur'evich LETYAGIN[1]

[1] *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of SB RAS 630060, Novosibirsk, Timakov str., 2*

[2] *Vector-Vita Ltd. 630060, Novosibirsk, Primorskaya str., 33-212*

[3] *Boreskov Institute of Catalysis of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 5*

The purpose of this work was a comparative study of the particle sizes of commercial preparations of colloidal silver by the method of electron microscopy, in connection with the characteristics of specific antimicrobial activity of the preparations under the same conditions. Four commercial preparations of colloidal silver were investigated: Vitargol Forte (manufactured by NPC «Elusan»), Protalor (manufactured by OOO «Esko-Farm», Armenia), Sialor (manufactured by PFK «Obnovlenie»). Protargol (prescription drugstore) served as the drug of comparison. **Material and methods**. The silver particle sizes in the preparations were determined by high-resolution transmission electron microscopy using a JEM 2010 electron microscope (JEOL, Japan) with a resolution of 0.14 nm at an accelerating voltage of 200 kV. The antimicrobial activity of the silver protein preparations was studied by a standard serial dilution method in liquid nutrient media and diffusion method using bacterial cultures of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Results and discussion. Vitargol Forte, manufactured using advanced technology, is the most fine-dispersed and monodisperse preparation. The preparation of standard classical Protargol, prepared in pharmacy conditions, was the most coarsely dispersed and polydispersed. **The conclusion**. The dependence of antimicrobial activity of the preparation on the size of its silver particles was shown. Of the four investigated preparations of silver proteinate, the smallest particle size was in the Vitargol Fort preparation. The same drug showed the highest bactericidal and bacteriostatic activity.

Key words: colloidal silver, silver proteinate, particle size, bactericidal action, bacteriostatic action.

Burmistrov V.A. *– candidate of chemical sciences, director, e-mail: vector-vita@ngs.ru*
Zaykovskiy V.I. *– candidate of chemical sciences, senior researcher, e-mail: viz@catalysis.ru*
Burmistrov A.V. *– deputy director, e-mail: vector-vita@mail.ru*
Rachkovskaya L.N. *– candidate of chemical sciences, head of laboratory, e-mail: noolit@niikel.ru*
Shurlygina A.V. *– doctor of medical sciences, professor, leading researcher, e-mail: anna_v_s@mail.ru*
Popova T.V. *– junior researcher, e-mail: noolit@niikel.ru*
Robinson M.V. *– senior researcher, e-mail: mil777@ngs.ru*
Korolev M.A. *– candidate of medical sciences, head of laboratory, e-mail: kormax@bk.ru*
Letyagin A.Yu. *– doctor of medical sciences, professor, head of research institute, e-mail: letyagin-andrey@yandex.ru*