

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ СЕРЕБРА В МЕДИЦИНЕ

Гарасько Е.В., Шилиев Р.Р., Чуловская С.А., Парфенюк В.И.

ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава

Кафедра микробиологии и вирусологии

Государственное учреждение «Институт химии растворов РАН»

Лаборатория «Электрохимические процессы в конденсированных ионных средах»

РЕЗЮМЕ Приводятся результаты экспериментальных исследований биоцидных свойств наноразмерных порошков серебра, полученных методом катодного восстановления из водно-органических растворов электролитов. Отмечаются существенные различия антимикробной активности металлического серебра и наноразмерных частиц серебра, что отражает возможность применения ультрадисперсных металлических порошков в медицине для модификации традиционных медицинских материалов с целью придания им эффективных биоцидных свойств.

Ключевые слова: нанотехнологии, электролиз, наноразмерные порошки серебра, биоцидность.

Нанотехнологию определяют как междисциплинарную науку, изучающую возможности применения материалов малых размеров (от 1 до 100 нм) для разработки устройств и систем таких же размеров, в которых с новыми целями используют необычные, известные или неизвестные ранее эффекты. Нанотехнология трактуется как область исследования, нацеленная на понимание процессов, происходящих в структурах в диапазоне от 1 до 100 нм. Свойства этих структур принципиально отличаются от свойств индивидуальных атомов или молекул обычных микропредметов, окружающих человека [5, 14, 15].

Слово «нано» стремительно вошло в нашу жизнь, многие отрасли имеют дело с наночастицами, среди них и медицина. Мысль о применении микроскопических устройств в медицине впервые была высказана в 1959 г. знаменитым

американским физиком Ричардом Фейнманом, описавшим микроробота, который проникает через сосуды в сердце для выполнения операции по исправлению клапана. Сегодня нанотехнологиями активно занимаются примерно в 50 странах, среди которых лидируют США, Япония, Южная Корея, Германия. В области наномедицины явное первенство принадлежит России в изучении и применении наночастиц металлов [1, 4, 8].

Бактерицидные и ранозаживляющие свойства серебра известны медицине давно. Но если серебро и прочие металлы использовать в виде наночастиц, эти свойства резко усиливаются. Поэтому в настоящее время значительный интерес вызывает синтез нанопорошков металлов — интерес как со стороны фундаментальной науки, изучающей основополагающие принципы формирования и устойчивости наносистем,

Garasko E.V., Shilyaev R.R., Chulovskaya S.A., Parfeniuk V.I.

USAGE OF SILVER POWDER NANOPARTICLES IN MEDICINE

ABSTRACT Results of experimental studies upon the problem of biocide properties of silver powder nanoparticles are adduced; the latter are obtained by the method of cathode restoration from water-organic electrolyte solutions. Significant differences in antimicrobial activity of metallic silver and silver powder nanoparticles are noted; this fact reflects the possibility of ultradispersional metallic powders usage in medicine for traditional medical materials modification in order to impart effective biocide properties to them.

Key words: nanotechnologies, electrolysis, silver powder nanoparticles, biocidity.

так и со стороны прикладной, для которой актуально создание качественно новых медицинских материалов и препаратов [6, 12].

Целью настоящей работы является исследование антимикробной активности медицинских материалов, модифицированных наноразмерными порошками серебра.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Модификацию традиционных медицинских материалов (марлю и лейкопластырь на марлевой основе) проводили наноразмерными порошками серебра (НРПС) для придания полученным композитам более эффективных биоцидных свойств. НРПС получали электровосстановлением из водно-этанольных растворов нитрата серебра по разработанной нами методике [9, 10]. Базой для получения высокодисперсных порошков служили губчатые катодные осадки, полученные на предельных плотностях тока.

Спектр физико-химических свойств порошков варьировал в установленных пределах, включая состав электролита, электрические режимы и другие факторы процесса. Требуемая устойчивость НРПС достигалась при введении в электролит низкомолекулярных поверхностно-активных веществ, действие которых проявлялось в перераспределении соотношения скоростей образования и роста новой фазы за счет блокировки активных центров и изменения поверхностной энергии на границах раздела фаз. Технологические операции (например, отмывка), проводимые с НРПС, также приводили к изменению их физико-химических свойств, в частности гранулометрического состава, вследствие коагуляции или дробления частиц, а также химического состава.

Информацию о размере и форме частиц НРПС получали методом просвечивающей электронной микроскопии на электронном микроскопе ЭМВ-100 Л в режиме высокого разрешения [11, 13]. Для достоверной характеристики дисперсного состава порошков делали электронные микроснимки разных участков образца при многочисленных увеличениях.

Рентгенограммы снимали на дифрактометре ДРОН — 3М с использованием $\text{Cu-K}\alpha$ излучения ($\lambda = 0,154$ нм). Качественный состав НРПС определяли путем сопоставления межплоскостных расстояний дифрактограмм исследуемого порошка со справочными данными [7].

Антибактериальное действие медицинского материала с наночастицами серебра, а также листовой серебряной фольги толщиной 0,3 мм изучали на грамположительных прокариотах

(фирмикутных бактериях) рода *Staphylococcus*. В качестве тест-микроба использовали типовой вид рода *Staphylococcus* — *Staphylococcus aureus* — ассоциированный с кожными покровами и слизистыми оболочками, способный вызывать оппортунистические инфекции.

При исследовании биоактивности образцов использованы методы, предложенные для установления антимикробной активности антисептиков, нанесенных на текстильные материалы путем пропитки [2, 3]. Суточную культуру тест-штамма на скошенном мясопептонном агаре смывали физиологическим раствором и подвели под оптический стандарт мутности, соответствующий 5 единицам (500 млн микробных клеток в 1 мл). Из исходной стандартной взвеси готовили десятикратные разведения, достигая рабочей концентрации 1000 микробных клеток в 1 мл.

Испытания образцов на бактерицидность проводили в двух вариантах по представленной ниже методике.

По первому варианту — посев «газоном» — в чашки Петри с мясопептонным агаром вносили 1,0 мл тест-культуры, сверху помещали испытуемые образцы размером 10×10 мм. Чашки Петри инкубировали 24 часа в термостате при 37°C. Об антимикробной активности испытуемых образцов судили по степени угнетения роста микроорганизмов (зона ингибиции до 10 мм — отсутствие биоактивности, 11—15 мм — слабая активность, 15—25 мм — выраженная активность; зона, превышающая 25 мм, свидетельствует о высокой антимикробной активности).

Для выявления пролонгированного действия наночастиц серебра на микроорганизмы в ходе эксперимента через 24 часа инкубации в термостате чашки выдерживали еще 24 часа при комнатной температуре, затем испытуемые образцы снимали с поверхности инфицированного агара и длительно выдерживали чашки Петри при комнатной температуре, фиксируя изменения результатов на 7, 14-е сутки и т.д.

По второму варианту аналогично методике определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам в жидкой питательной среде испытуемые образцы помещали в пробирки с 9,0 мл мясопептонного бульона и 1,0 мл тест-культуры взвеси микроорганизмов (посевная доза — 1000 клеток в 1 мл). Пробирки инкубировали при температуре 37°C 24 часа и выдерживали в течение суток при комнатной температуре. Учет результатов включал определение коэффициентов пропускания и оптической плотно-

сти раствора в пробирках с исследуемыми и контрольными образцами на фотоэлектрическом концентрационном колориметре КФК-2. Затем для подтверждения наличия бактерицидных свойств у исследуемых образцов проводился высеив из всех пробирок на чашки Петри с желудочно-солевым агаром для подсчета выросших колоний и определения колониеобразующих единиц (КОЕ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследований биоактивности применен НРПС, полученный электровосстановлением из водно-этанольного раствора нитрата серебра. Средний размер частиц — 60 нм (рис. 1).

Из анализа значений межплоскостных расстояний, соответствующих различным положениям максимумов на дифрактограмме НРПС, следует, что анализируемый порошок в основном состоит из Ag (рис. 2). Вероятные примеси или отсутствуют, или их количество ничтожно мало и не поддается анализу.

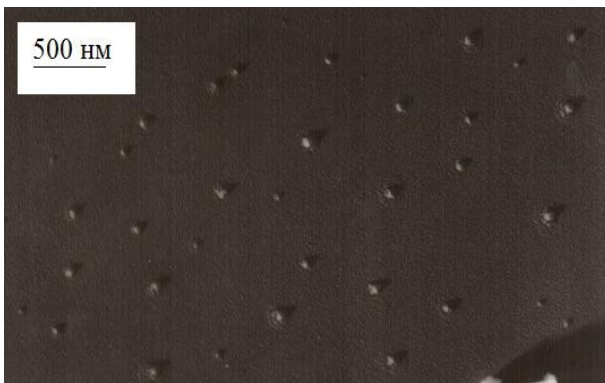


Рис. 1. Частицы НРПС, полученного электроосаждением из водно-этанольного раствора нитрата серебра. $\times 60\ 000$

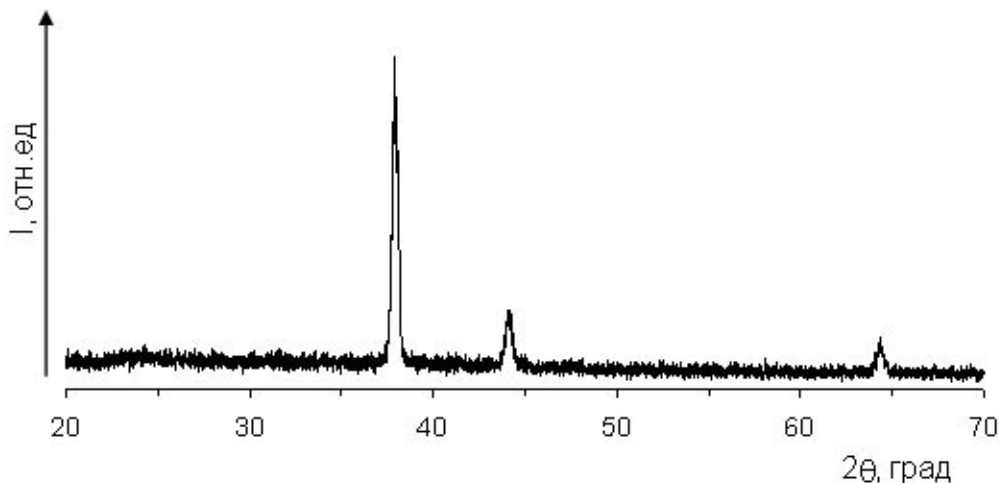


Рис. 2. Дифрактограмма НРПС

Результаты исследования биоактивности (табл. 1) показали, что чистые марля и лейкопластырь (образцы a, b), металлическое серебро (образец c) и модифицированные НРПС материалы (образцы d, f) ведут себя по-разному.

Таблица 1. Биоактивность и значения зон ингибции роста (мм) наноразмерными частицами серебра в отношении *Staphylococcus aureus*

Биоактивность	Образцы				
	a	b	c	d	f
отсутствует	10	10			
выраженная			17		
высокая				26	26

Как представлено на рис. 3, контрольные образцы (a, b) не проявляют антимикробной активности в отношении тест-культуры стафилококка.

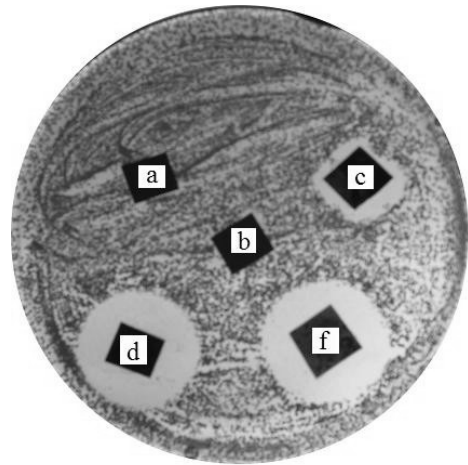


Рис. 3. Серебряная фольга (c), исходные перевязочные материалы (a, b) и модифицированные НРПС (d, f) после воздействия на бактериальный газон со штаммами *Staphylococcus* на плотной питательной среде в чашке Петри

Химически чистое металлическое серебро (с) хотя и характеризуется выраженной биоактивностью, но имеет значительно меньшую зону подавления роста тест-бактерий, чем материалы, модифицированные наноразмерными частицами серебра, обладающие, следовательно, более высокой биоактивностью (d, f).

Данный вариант испытаний рассматривается как модель развивающегося инфекционного процесса, включающего его начальный этап — адгезию микроорганизмов на поверхности кожи или слизистых и возможность ингибирования этого этапа для предотвращения развития инфекционного процесса с целью профилактики инфекции. В этой связи следует отметить, что преимущество НРПС перед остальными обеззараживающими реагентами заключается в том, что их бактерицидное действие сохраняется в течение длительного времени.

Воздействие серебра на микробную клетку осуществляется в два этапа: сначала происходит сорбция серебра на поверхности клетки, затем наблюдается проникновение его в клетку, что ведет к инактивации ферментов, повреждению нуклеотидов и лизису клетки. Химически чистое металлическое серебро обладает выраженной антимикробной активностью, но ионы серебра и ионогенные соединения серебра (вещества, способные в воде распадаться на ионы) проявляют более высокую биоактивность, и степень активности серебра тем выше, чем выше концентрация его ионов в растворе.

Таблица 2. Влияние НРПС на выживаемость *Staphylococcus aureus* в жидкой питательной среде

Показатели	Образцы					
	a	b	c	d	f	к*
Коэффициент пропускания, %	72	75	100	96	98	78
КОЕ/мл	1000>	1000>	0	0	0	1000>

Примечание: * — высев из контрольной пробирки, содержащей посевную дозу 1000 и более микробных клеток в 1 мл (без исследуемого образца)

В настоящем исследовании выявлено пролонгированное бактерицидное действие наноразмерных частиц серебра. Установлено, что при диффузии в течение 24—48 часов в питательный агар наночастиц серебра из образцов модифицированных материалов антимикробное дей-

ствие сохраняется длительное время после их удаления — в течение 7—14 суток. В зоне задержки роста и на месте удаленных наноразмеров не отмечается роста микробов, тогда как на месте контрольных образцов питательный агар быстро инфицируется.

Результаты микробиологических исследований биоактивности модифицированных материалов на плотной питательной среде коррелируют с результатами оценки биоактивности в жидкой питательной среде (табл. 2, рис. 4) с последующим высевом (рис. 5).

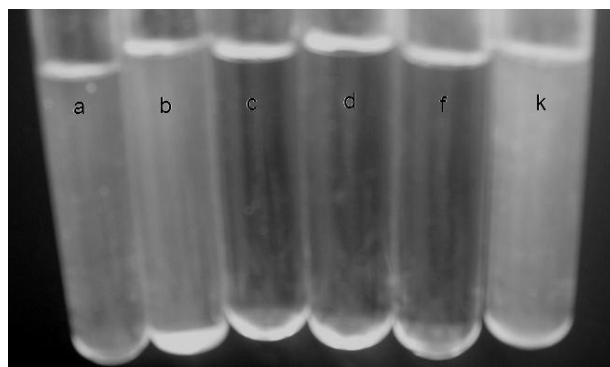


Рис. 4. Воздействие испытуемых (a, b, c, d, f) и контрольного (к) образцов на штаммы *Staphylococcus* в жидкой питательной среде

Как видно из представленных данных, металлическое серебро (с) в жидкой питательной среде проявляло столь же высокую биоактивность и полное подавление роста тест культуры, как и наночастицы серебра (d, f). Коэффициент пропускания в пробирках с данными образцами был максимальным (рис. 4).

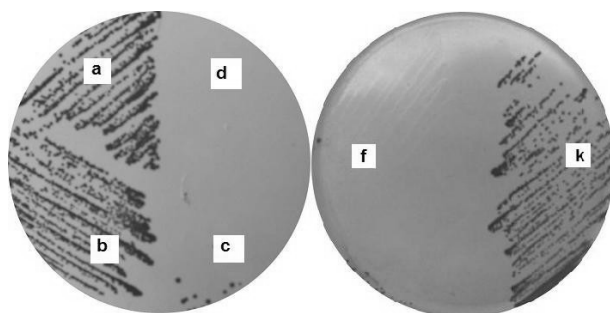


Рис. 5. Демонстрация воздействия испытуемых (a, b, c, d, f) и контрольного (к) образцов на штаммы *Staphylococcus* после высева из жидкой питательной среды

Отсутствие роста при высева из жидкой питательной среды подтверждает биоактивность исследуемых НРПС (рис. 5). Этот вариант испытаний можно рассматривать как модель уже развившегося инфекционного процесса, включающего размножение микроорганизмов в ране и

накопление условно-патогенных микроорганизмов в раневом отделяемом подлежащих тканей в диагностически значимом количестве (КОЕ = 10^3 и выше). Именно такое количество тест-микробов (1000 и более) содержалось в жидкой питательной среде при внесении в нее испытуемых образцов и было полностью инактивировано.

Таким образом, применение данной методики позволяет получить более точные результаты, подтверждающие полную гибель тест-микробов в жидкой среде с наноразмерными частицами серебра, что весьма существенно при антибиотикорезистентности возбудителей раневой инфекции, при лечении трофических язв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андриевский Р.А., Рагуля А.В. Наноструктурные материалы. — М.: Академия, 2005. — 192 с.
2. Вольф Л.А., Меос А.И. Волокна специального назначения. — М.: Химия, 1971. — 223 с.
3. Гарасько Е.В. Антимикробные свойства специальной ткани // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. — 1973. — С. 54—56.
4. Губин А.П., Кокшаров Ю.А., Хомутов Г.Б., Юрков Г.Ю. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // Успехи химии. — 2005. — Т. 74. — С. 539—569.
5. Гусев А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии. — М.: Физматлит, 2005. — 416 с.
6. Егорова Е.М., Ревина А.А., Ростовщикова Т.Н. и др. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах // Вестн. Моск. ун-та. — Сер. 2. Химия. — 2001. — Т. 42. — С. 332—338.
7. Миркин Л.И. Справочник по рентгеноструктурному анализу поликристаллов. — М.: Физматиздат, 1961. — 863 с.
8. Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е. Наночастицы металлов в полимерах. — М.: Химия, 2000. — 672 с.

ВЫВОДЫ

1. Применение серебра в наноразмерной форме позволяет в сотни раз снизить его концентрацию с сохранением бактерицидных свойств этого металла в химически чистой форме.
2. Большая удельная площадь поверхности модифицированных материалов увеличивает область контакта наночастиц серебра с микроорганизмами, повышая его бактерицидные свойства.
3. Новая форма серебра — наносеребро — открывает широкие возможности для создания эффективных медицинских материалов с высокой биоактивностью.

9. Чуловская С.А., Балмасов А.В., Лилин С.А., Парфенюк В.И. Электрохимическое получение ультрадисперсных медьсодержащих частиц из водно-органических растворов электролитов // Защита металлов. — 2006. — Т. 42. — С. 430—433.
10. Чуловская С.А., Парфенюк В.И. Влияние изопропилового спирта на процесс катодного осаждения ультрадисперсных медьсодержащих порошков из растворов электролитов. // ЖПХ. — 2007. — Т. 80. — С. 952—955.
11. Шабанова Н.А., Попов В.В., Саркисов П.Д. Химия и технология нанодисперсных оксидов. — М.: Академкнига, 2006. — 309 с.
12. Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N. et al. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties // Chem. Mater. — 2005. — Vol. 17. — P. 5255—5262.
13. Jose-Yacamán M., Ascencio J.A. Electron Microscopy Study of Nanostructured and Ancient Materials. *Nalva*. — 2000. — Vol. 2.— Ch. 8.
14. Nanoscale materials in chemistry / Ed. By K.J. Klabunde. — New York: A John Wiley & Sons Inc., 2001. — 292 p.
15. Poole Ch., Owens F. Introduction to Nanotechnology. — Wiley-Interscience, 2003. — 336 p.

Поступила 28.09.2008 г.