

STUDY OF DOSE-AND-TIME DEPENDENCE OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES

Surmasheva O.V., Mikhienkova A.I., Korchak G.I., Antomonov M.Yu., Nikonova N.O., Oliinyk Z.A., Romanenko L.I.

ВИВЧЕННЯ ДОЗО-ЧАСОВОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ НАНОЧАСТОК СРІБЛА



**СУРМАШЕВА О.В.,
МІХІЄНKOBA A.I., КОРЧАК Г.І.,
АНТОМОНОВ М.Ю.,
НІКОНОВА Н.О.,
ОЛІЙНИК З.А.,
РОМАНЕНКО Л.І.**

ДУ "Інститут гігієни та
медичної екології
ім. О.М. Марзєєва НАМН України",
м. Київ

УДК 579.63: 661.163:006.032,
648.6, 615.28

станнім часом все більшу увагу привертають до себе нанотехнології та матеріали, отримані за їх допомогою. Завдяки унікальним фізико-хімічним і антимікробним властивостям наноматеріали знаходять широке використання у різних галузях народного господарства, у т.ч. у медицині. Серед цих матеріалів вагоме місце посідають наночастки металів, зокрема наносрібло, антимікробні властивості якого були відомі ще з 80-х років XIX ст. [1, 2]. Дані світової літератури підтверджують більш високу бактерицидну активність нанорозмірних часток металу порівняно з іонною формою. Ефекти, які можна отримати завдяки застосуванню наночасток, залежать від технології

синтезу часток, їхнього розміру, хімічного походження стабілізатора, стійкості колоїдної системи, виду мікроорганізму, хімічного складу композиції на їх основі тощо.

Тому всебічна оцінка нанотехнологій та наноматеріалів, у тому числі отримання антимікробних препаратів, вивчення механізмів взаємодії мікроорганізмів і наночасток є актуальними і перспективними [3-6].

Для отримання бажаного результату необхідно мати комплексну характеристику усіх складових засобу, що розробляється, відокремити найвагоміші, спираючись на обґрунтований методичний підхід до вивчення наноматеріалів.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОЗО-ВРЕМЕННОЙ ЗАВИСИМОСТИ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Сурмашева Е.В., Михиенкова А.И., Корчак Г.И., Антомонов М.Ю., Никонова Н.А., Олейник З.А., Романенко Л.И.

Целью данной работы было изучение зависимости антимикробного эффекта наночастиц серебра от их концентрации и экспозиции с помощью математической модели.

Материалы и методы исследования.

Материалом для создания математической модели была серия исследований по изучению антимикробных свойств коллоидного раствора наночастиц серебра и композита на его основе в матрице высокодисперсного кремнезема. Перечисленные объекты были синтезированы сотрудниками Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАНУ путем фотохимического восстановления из раствора нитрата серебра в присутствии тетрагидробората натрия.

В качестве стабилизатора использовали смесь поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия и полимера — поливинилпирролидона. Средний размер частиц, который фиксировали с помощью пропускающей электронной микроскопии, был на уровне 8-12 нм; концентрацию наночастиц

определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии.

Полученные результаты по изучению антимикробного действия растворов наночастиц серебра, сроков его сохранения, а также зависимости эффективности от происхождения стабилизаторов и белковой нагрузки были изучены и опубликованы ранее. Была выявлена динамика процессов увеличения антимикробной активности изучаемых объектов и предложена математическая модель, алгоритм построения которой состоял из нескольких этапов. Табличные данные сравнивали с разработанной моделью с помощью статистического пакета "STATISTICA 6.0", благодаря которому были рассчитаны значения математических параметров, использованные в дальнейшем для детального изучения полученных результатов.

Созданная математическая модель продемонстрировала зависимость антимикробного действия наночастиц серебра от их концентрации и экспозиции, что не противоречит общепринятому в биологии правилу "доза — время — эффект".

Ключевые слова: антимикробная активность, наночастицы серебра, высокодисперсный кремнезем, математическая модель, зависимость "доза — время — эффект".

© Сурмашева О.В., Міхієнкова А.І., Корчак Г.І., Антомонов М.Ю., Ніконова Н.О., Олійник З.А., Романенко Л.І. **СТАТТЯ, 2012.**

STUDY OF DOSE-AND-TIME DEPENDENCE OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES

Surmasheva O.V., Mikhienkova A.I., Korchak G.I., Antomonov M.Yu.,

Nikonova N.O., Oliinyk Z.A., Romanenko L.I.

Study of antimicrobial effect dependence of silver nanoparticles upon their concentration and exposure with a help of the mathematical model was an objective of a given work.

Materials and methods of the study. A run of the investigations for the study of antimicrobial properties of the colloid solution of silver nanoparticles and composite on its base in the matrix of highly dispersive silica was a material for the creation of mathematical model. The mentioned objects were synthesized by the specialists of A.A. Chuiko Institute for Surface Chemistry, NASU, by means of photochemical reduction from the solution of silver nitrate at the presence of sodium tetrahydroborate. A mixture of the surface-active substance — sodium dodecyl sulphate and polymer — polyvinylpyrrolidone was used as a stabilizer. Average particle size, fixed with the help of transmitting electronic

microscopy, was at the level of 8-12 nm; nanoparticle concentrations were determined by the method of atomic-and-adsorptive spectroscopy. The obtained results of the antimicrobial effect study of silver nanoparticle solutions, terms of its preservation, and also a dependence of the efficiency upon the origin of stabilizers and protein loading were studied and published earlier.

A dynamics of the process of the increase of antimicrobial activity of studied objects was revealed and a mathematical model, algorithm of its creation included several stages. The table data were compared with the developed model with the help of STATISTICA 6.0 statistical packet. The meanings of the mathematical parameters used in further for a detail study of the obtained results were calculated owing to it.

Created mathematical model has demonstrated a dependence of antimicrobial effect of silver nanoparticles from their concentration and exposure. It doesn't contradict a general dose-time-effect biological rule.

Keywords: antimicrobial activity, silver nanoparticles, highly dispersed silica, mathematical model, dose — time — effect dependence.

Комплекс результатів, отриманих нами у ході вивчення антимікробної активності наночасток срібла, дозволив обґрунтувати методичний підхід до проведення подібних досліджень і представити алгоритм їх виконання у наступних публікаціях [7, 8].

Метою даної роботи було вивчення залежності антимікробної дії наночасток срібла від їх концентрації та тривалості експозиції за допомогою математичної моделі.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для створення математичної моделі служила серія досліджень з вивчення антимікробних властивостей колоїдного розчину наночасток срібла (НЧ Ag) та композиту на його основі з використанням суспензії високодисперсного кремнезему (ВДК), на поверхні якого було адсорбовано наносрібло. Перелічені об'єкти дослідження були синтезовані співробітниками Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАНУ шляхом фотохімічного відновлення у присутності тетрагідроборату натрію (NaBH_4) з нітрату срібла (AgNO_3). В якості стабілізатора використовували суміш поверхнево-активної речовини додецилсульфату натрію (ДСН) та полімеру — полівінілпіролідону (ПВП). Отрима-

ний колоїд срібла мав середній розмір часток, який фіксували за допомогою пропускаючої електронної мікроскопії (ПЕМ) на рівні 8-12 нм; концентрацію наночасток визначали методом атомно-адсорбційної спектроскопії.

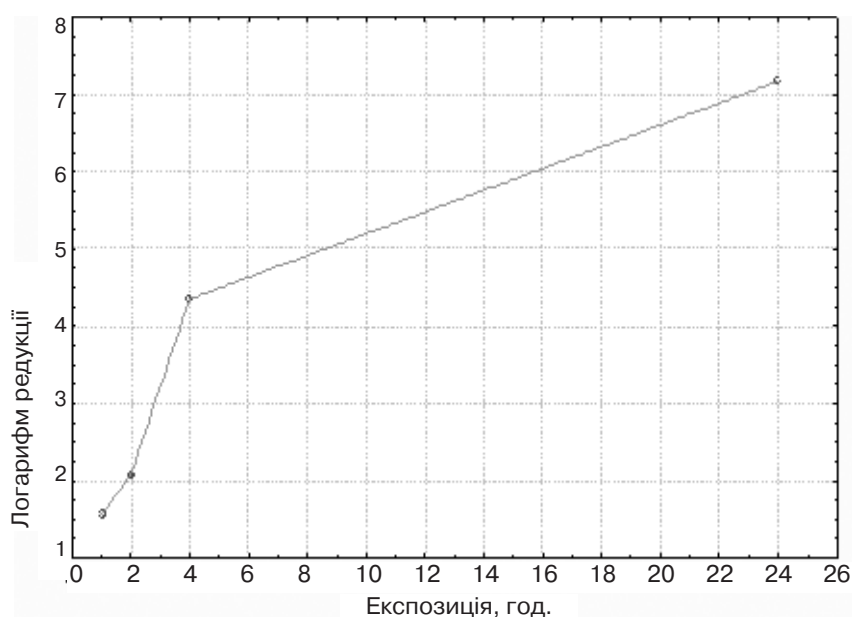
Раніше вже було вивчено антимікробну активність колоїдного розчину НЧ Ag та композиту на його основі — НЧ Ag/ SiO_2 , а також визначено строки її зберігання. Крім того, було продемонстровано залежність антимікробної дії від

походження стабілізатора та величини білкового навантаження, що знайшло відображення у попередніх публікаціях [9, 10].

У ході експериментального дослідження й аналізу даних було виявлено динаміку процесів зростання антимікробної активності вивчених об'єктів. Тому було вирішено на основі отриманих результатів розробити математичну модель, алгоритм побудови якої складався з таких етапів:

Рисунок 1

Приклад залежності



наміка процесу і залежність "час — ефект". Ці дані використали для побудови графіків, приклад яких показано на рис. 1.

Вказаний графік (рис. 1) було побудовано за результатами вивчення антимікробної дії щодо *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*,) стабілізованого бінарною сумішшю 0,0016% колоїдного розчину НЧ срібла [9].

Після аналізу отриманих графіків, побудованих за обраними даними, виходячи з логіки процесу та різновидів графіків, в якості моделі було застосовано таку математичну функцію:

$$y = y_{\max} (1 - \exp(-kt^n)),$$

де $y_{\max}$ — гранично допустима кількість мікроорганізмів у контролі культури, яка знаходиться на рівні 7,7 lg; k — показник (характеристика) швидкості процесу; n — показник вигину кривої (характеристика нелінійності процесу); t — час.

Аналізуючи первинні графіки, подібні до графіка на рис. 1, та вказану функцію, розраховували математичні параметри для усіх обраних результатів і побудовували криві, які мали плавний вигляд. Зокрема, залежність, представлена на рис. 1, після вказаної обробки мала інший вигляд (рис. 2).

За допомогою статистичного пакету "STATISTICA 6.0" обрані табличні дані порівнювали з розробленою моделлю динаміки зростання антимікробної активності. У результаті математичної обробки було розраховано значення наступних параметрів, за якими характеризували отримані дані: k і його вірогідність p_k ; n і його вірогідність p_n ; R — коефіцієнт кореляції даних; F — адекватність усієї моделі. Крім вказаного, використана математична модель дозволила розраховувати критичний час (t^*) подолання необхідного логарифму редукції R на рівні 5,0 lg (табл. 2-6).

Облік отриманих даних розпочинали з аналізу показників F і R . Перший характеризує адекватність дослідних результатів побудованій моделі зростання антимікробної активності (рис. 2), другий — їхню кореляцію. Значення показників швидкості процесу (k) зростання антимікробної дії дослідних зразків та критичний час (t^*) для подолання межі у 5,0 lg перебуває у зворотно-пропорційній залежності: при збільшенні k зменшується час для досягнення необхідного ефекту і навпаки.

На відміну від загальноприйнятого рівня достовірності 95,0% у мікробіології ще 1987 року було доведено, що для санітарно-мікробіологічних досліджень прийнято є достовірність результатів на рівні 90,0%.

□ відбір вихідних табличних даних;

□ побудова графіків за вихідними фактичними даними динаміки процесів;

□ вибір математичної моделі;

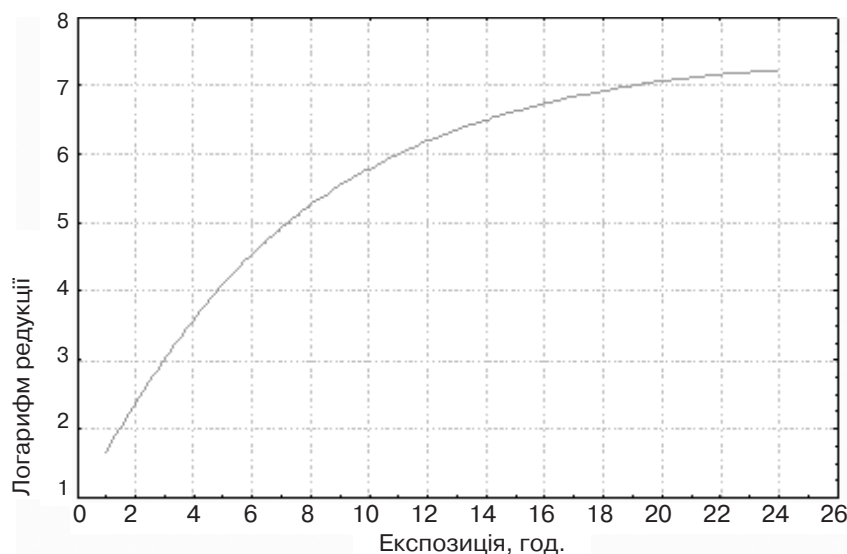
□ розрахунок параметрів математичної моделі;

□ аналіз отриманих результатів.

У ході вивчення фактичних даних було обрано результати визначення антимікробної активності дослідних зразків, в яких прослідковувалися ди-

Рисунок 2

Модель динаміки зростання антимікробної активності на прикладі 0,0016% колоїдного розчину НЧ срібла, стабілізованого бінарною сумішшю, у відношенні *S. aureus*



Вплив стабілізаторів на антимікробну активність зразків

Назва зразка та концентрація	Математичні параметри						
	k	p_k	n	p_n	R	F	t^*
0,0016% НЧ Ag ДСН - <i>S. aureus</i>	0,67	0,46	0,53	0,17	0,83	4,47	2,31
0,0016% НЧ Ag ДСН + ПВП - <i>S. aureus</i>	0,22	0,01	0,80	0,01	0,99	77,51	7,00
0,0016% НЧ Ag ДСН + ПВП - <i>P. aeruginosa</i>	0,69	0,10	0,56	0,02	0,98	57,77	2,13

Таблиця 1

Цей підхід для оцінки отриманих даних знайшов відображення також в європейських стандартах [11], за методиками і положеннями яких було проведено експериментальні дослідження і здійснено розрахунки результатів. Тому усі результати, які описано у публікаціях, мають рівень достовірності, щонайменше, 90,0%, і вірогідність помилки перебуває у межах $p < 0,1$.

Виходячи з отриманих результатів щодо впливу хімічного походження стабілізатора на антимікробну активність колоїдних розчинів НЧ Ag (табл. 1) можна сказати, що необхідний Ig R 5,0 у випадку використання для стабілізації тільки ДСН було досягнуто за коротший час контакту (2,31 год.), але показники F і R були на невисокому рівні, також мала місце велика вірогідність помилки ($p=0,17$). Водночас математичні параметри з обліку результатів протимікробного ефекту колоїду наносрібла, стабілізованого бінарною сумішшю, на моделі *S. aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) мали високі показники F і R, які достовірно ($p=0,01$ та $p=0,02$ відповідно) свідчать про досягнення необхідної редукції за 7,00 год. та 2,13 год. контакту відповідно.

Визначення впливу концентрацій колоїдного розчину НЧ срібла за математичними па-

раметрами на бактерицидну властивість їх проведено на моделі чутливості *P. aeruginosa* (табл. 2).

Як видно з даних табл. 2, зменшення концентрації НЧ срібла з 0,0016% до 0,0004% призводило до пролонгації часу експозиції t^* з 2,13 год. до 5,41 год. для отримання Ig R 5,0, що не суперечить загальноприйнятій у біології залежності "доза — час — ефект".

Така саме залежність антимікробного ефекту від концентрації та тривалості експозиції прослідковувалася і під час вивчення композиту НЧ срібла у матриці ВДК (табл. 3 і 4).

При аналізі математичних параметрів (табл. 3 і 4) привертає увагу той факт, що антимікробний ефект композиту НЧ Ag/SiO₂ у базовій концентрації (0,0016%) щодо бактерій (*P. aeruginosa* і *S. aureus*) досягався за 5,25 год. та 1,4 год. відповідно, хоча такі дані не є достовірними ($p=0,19$ та $p=0,16$ відповідно), і показники F і R замалі.

Всупереч цьому при використанні робочих розчинів суспензії спостерігалася поступове зростання антимікробної дії композиту з плином часу, причому чим більшим було розбавлення, тим меншою вірогідність похибки. Так, при застосуванні композиту НЧ Ag/SiO₂ у концентрації 0,0008% щодо *P. aerugino-*

sa і *S. aureus* значення $p=0,03$ та $p=0,01$ відповідно; 0,0004% — $p=0,004$ та $p=0,002$ відповідно. Найбільш адекватні за показником R результати було отримано при вивченні найменшої концентрації композиту за наносріблом (0,0004%) щодо грамнегативної та грампозитивної мікрофлори. Такі дані можуть свідчити на користь того, що при використанні ще менших концентрацій НЧ срібла у матриці діоксиду кремнію і подовженні експозиції будуть отримані достовірні результати з антимікробної активності.

Також математична обробка результатів показала суттєву різницю у чутливості мікроорганізмів залежно від їхньої видової приналежності. Так, представники грампозитивної мікрофлори були чутливішими за представників грамнегативної мікрофлори до дії НЧ Ag/SiO₂ у середньому в 1,5 рази.

Таблиця 2

Вплив концентрації НЧ срібла на його антимікробну активність (на моделі *P. aeruginosa*)

Назва зразка та концентрація	Математичні параметри						
	k	p_k	n	p_n	R	F	t^*
0,0016% НЧ Ag ДСН + ПВП	0,69	0,10	0,56	0,02	0,98	57,77	2,13
0,0008% НЧ Ag ДСН + ПВП	0,58	0,04	0,619	0,01	0,99	94,3	2,61
0,0004% НЧ Ag ДСН + ПВП	0,16	0,08	1,13	0,07	0,93	12,31	5,41

Таблиця 3

Вплив концентрації НЧ срібла у матриці ВДК на антимікробну активність (на моделі *P. aeruginosa*)

Назва зразка та концентрація	Математичні параметри						
	k	p_k	n	p_n	R	F	t^*
0,0016% НЧ Ag/SiO ₂	0,18	0,21	1,06	0,19	0,82	3,96	5,25
0,0008% НЧ Ag/SiO ₂	0,15	0,04	0,76	0,03	0,91	13,89	12,94
0,0004% НЧ Ag/SiO ₂	0,06	0,002	0,85	0,004	0,98	65,92	29,24

Статистична обробка результатів та побудова моделі показали нелінійність процесу відмирання мікроорганізмів. Основна їх кількість гинула у перші години експозиції, тобто антимікробній дії підлягала спершу найбільш чутлива частина популяції. Залежно від виду мікроорганізму антимікробний ефект був на рівні 3,0-5,0 lg R. Відмирання залишкової частини мікрофлори, найбільш стійкої до дії засобу, було пролонговано у часі, вимірюваному днями. Згідно з розробленою моделлю теоретично такі стійкі форми мікроорганізмів можуть зустрічатися за вихідної їх кількості на рівні 7,0-8,0 lg. Ця особливість обумовила різну швидкість антимікробної дії, як наслідок, графіки мали вигляд нелінійної залежності.

Таким чином, отримані результати і розроблена на їх основі математична модель продемонстрували чітку залежність антимікробної дії НЧ срібла як у колоїдному розчині, так і у вигляді композиту, від концентрації наночастинок та використаної у досліді тривалості експозиції. Крім вказаного, було розраховано критичний час подолання необхідного за європейськими стандартами логарифма редукції, який перебуває на рівні 5,0 lg R. Такі дані дозволяють спрогнозува-

ти для подальшої роботи ймовірний час для отримання 5,0 lg R при зменшенні концентрації НЧ срібла нижче 0,0004%.

Все вищевикладене не суперечить загальноприйнятій у біології залежності "доза — час — ефект", який підтвердила застосована математична модель обробки отриманих результатів. Запропоновану модель також можна використовувати для оцінки антимікробних ефектів, що спричиняють наночастинки срібла, в інших концентраціях та за інших експозицій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А. Кудринский, А.Ю. Оленин и др. // Успехи химии. — 2008. — Т. 77, № 3. — С. 242-269.
2. Препарати срібла: вчора, сьогодні і завтра / О.Б. Щербаков, Г.І. Корчак, О.В. Сурмашева та ін. // Фармацевтичний журнал. — 2006. — № 5. — С. 55-67.
3. Sondy I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria / I. Sondy, B. Salopek-Sondy // Colloid Interface Sci. — 2004. — № 275. — P. 177-182.
4. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho et al. // Nanotechnology. — 2005. — Vol. 16, № 10. — P. 2346.
5. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes / G. A. Martinez, Nino-Martinez, Martinez-Gutierrez et al. // J. of Nanoparticle Research. — 2008. — Vol. 10, № 8. — P. 1343-1348.
6. Aruna Jyothi Kora. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action / Aruna Jy-

othi Kora, J. Arunachalam // World J. of Microbiology and Biotechnology. — 2011. — Vol. 27, № 5. — P. 1209-1216.

7. Алгоритм методичного підходу до визначення антимікробної активності наноматеріалів і композицій на їх основі / Сурмашева О.В., Корчак Г.І., Міхienкова А.І., Ніконова Н.О. // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу: зб. тез. доп. наук.-практ. конф. (Львів, 17-18 травня 2012 р.). — Львів, 2012. — Вип. 9. — С. 229-233.

8. Изучение антибактериальных свойств наноматериалов: обоснование методического подхода / Е.В. Сурмашева, Г.И. Корчак, А.И. Михиенкова, Н.А. Никонова, Л.И. Романенко // Матер. XI Всерос. съезда гигиенистов и сан. врачей РФ (Москва, 2012). — М., 2012. — Т. II. — С. 255-257.

9. Михиенкова А.И. Наночастицы серебра: характеристика и стабильность антимикробного действия коллоидных растворов / А.И. Михиенкова, Ю.П. Муха // Довкілля та здоров'я. — 2011. — № 1. — С. 55-59.

10. Сердюк А.М. Наночастицы серебра: характеристика и стабильность антимикробного действия композиции на основе высокодисперсного кремнезема / А.М. Сердюк, А.И. Михиенкова // Довкілля та здоров'я. — 2011. — № 3. — С. 8-11.

11. EN 13727:2003 Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area — Test method and requirements (phase 2, step 1). — Brussels: European Committee for Standardization, 2003. — 36 p.

Надійшла до редакції 05.08.2012.

Таблиця 4

Вплив концентрації НЧ срібла у матриці ВДК на антимікробну активність (на моделі *S. aureus*)

Назва зразка та концентрація	Математичні параметри						
	k	ρ_k	n	ρ_n	R	F	t*
0,0016% НЧ Ag/SiO ₂	0,90	0,79	0,45	0,16	0,84	4,97	1,4
0,0008% НЧ Ag/SiO ₂	0,33	0,03	0,56	0,01	0,95	28,41	8,16
0,0004% НЧ Ag/SiO ₂	0,18	0,001	0,58	0,002	0,99	103,11	20,36