



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68895** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2011 13199	(72) Винахідник(и): Савченко Дмитро Сергійович (UA), Чекман Іван Сергійович (UA), Балко Олександр Богданович (UA), Воронін Євгеній Пилипович (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.11.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2012, Бюл.№ 7	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОКОМПОЗИТУ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ ТА КЛАСТЕРІВ СРІБЛА

(57) Реферат:

Спосіб оцінки ефективності застосування нанокomпозиту високодисперсного кремнезему та кластерів срібла включає проведення мікробіологічних досліджень протимікробних властивостей. Оцінюють ефективність композиту по мінімальній інгібуючій концентрації та мінімальній бактерицидній концентрації.

UA 68895 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до експериментальної медицини, точніше до визначення протимікробної активності і може використовуватися для покращення результатів застосування препаратів на основі високодисперсного кремнезему.

Значний науково-практичний інтерес мають дослідження препаратів з наносрібла, що проявляють активність проти мікроорганізмів, в тому числі, стійких до антибіотиків [1]. Саме тому розробка методів оцінки ефективності даних нових лікарських засобів, синтезованих шляхом нанотехнологій, з більш вираженими фармакологічними властивостями, є актуальним завданням сьогодення [2].

Проведені дослідження показали можливість формування нанокластерів срібла шляхом механосорбційного покриття поверхні нанорозмірного кремнезему моношаром срібла нітрату (AgNO_3) у газовому дисперсійному середовищі і наступного термолізу солі. Розроблений і синтезований спільними зусиллями вчених Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця та Інституту хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України нанокompозит "високодисперсний кремнезем-кластери срібла" розглядається як перспективний препарат комплексної антибактеріальної і сорбційно-детоксикаційної дії для застосування у медичній практиці [3,4].

Таким чином, важливою частиною застосування нанокompозиту, є протимікробними ефект, що пов'язаний з сорбційними та детоксикаційними властивостями.

Існує спосіб оцінки протимікробних властивостей нанокompозиту "високодисперсний кремнезем-кластери срібла" [5]. Однак, вказаний спосіб не дозволяє оцінити клініко-фармакологічну ефективність застосування нанокompозиту в медичній практиці.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу, що заявляється, є спосіб дослідження протимікробної активності та ефективності [6], який виступає як прототип. Цим способом досліджують протимікробні властивості композиту високодисперсного композиту кремнезему срібла, за допомогою мікробіологічного дослідження на мікроорганізмах штамів: *Escherichia coli* (ATCC 2732), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pseudomonas fluorescens* (LME 2333), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (DI), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (DB 7155), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Listeria monocytogenes* (Scott A), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Aspergillus niger* (ATCC 9642).

Однак, цей спосіб має недоліки, так як він має низьку інформативність для медичної практики через те, що в ньому використовуються штами мікроорганізмів, які не є тестовими штамми для визначення антимікробної дії лікарських засобів, потребує використання спеціальних поживних середовищ та отримання ліцензії та організації спеціальних умов для роботи зі штамми даних мікроорганізмів.

Задачею корисної моделі є встановлення ефективності застосування нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла", як протимікробного лікарського засобу.

Технічний результат, який досягається, полягає в удосконаленні методів оцінки протимікробної активності препаратів наночастинок срібла.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, що передбачає мікробіологічні дослідження протимікробних властивостей нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла", згідно корисної моделі, оцінюють ефективність композиту по мінімальній інгібуючій концентрації та мінімальній бактерицидній концентрації по відношенню до *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (ATCC 25923), *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922), *Candida albicans* УКМ Y-1918 (ATCC 885-653), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027), отримані результати порівнюють з активністю срібла нітратом і при нормалізації показників оцінюють ефективність препарату.

Переваги цього способу: використання тестових штамів мікроорганізмів для визначення антимікробної дії лікарських засобів, зручність роботи з даними культурами мікроорганізмів, доступність даних культур мікроорганізмів, відсутність потреби проходження спеціального ліцензування для роботи з ними. За допомогою цього способу можливо прогнозувати ефективність застосування нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла", та проводити контроль протимікробної активності нової сполуки.

Спосіб здійснювався наступним чином.

Використані штами мікроорганізмів. Дослідження антимікробної активності нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" та нітрату срібла проводили на отриманих із УКМ (Українська колекція мікроорганізмів): *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (ATCC 25923), *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922), *Candida albicans* УКМ Y-1918 (ATCC 885-653), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027). Дані мікроорганізми є тестовими штамми для визначення антимікробної дії лікарських засобів [7].

Використані поживні середовища. Отримання добових культур мікроорганізмів, приготування вихідних і робочих суспензій мікроорганізмів та препаратів, визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (MIC) досліджуваних речовин проводили у рідкому середовищі LB (Luria-Bertani broth, Merck, Germany). Висів аліквот дослідних і контрольних суспензій для встановлення мінімальних бактерицидних/фунгіцидних концентрацій (MBC/MFC) препаратів проводили на щільне поживне середовище LB (Luria-Bertani medium, Merck, Germany) в чашки Петрі.

Дослідження антимікробних властивостей сполук. Вихідний розчин нанокмполиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" одержували шляхом розчинення 672,8 мг в 2 мл середовища LB. Отримана таким чином суспензія сполуки із концентрацією 336,4 мг/мл застосовували для визначення антимікробних властивостей щодо *S. aureus*. Для *C. albicans* концентрацію композиту у вихідному розчині знижували вдвічі (168,2 мг/мл). З цією метою 1 мл вихідного розчину змішували із аналогічними об'ємом вихідного середовища. Таким же ж чином досягали двократного зниження концентрації вихідного розчину (84,1 мг/мл) для дослідження активності щодо *E. coli* та *P. aeruginosa*. В подальшому, для кожного виду мікроорганізмів готували ряд із 12 пробірок, в які вносили по 0,5 мл середовища LB. Із вихідного розчину нанокмполиту відбирали 0,5 мл і вносили у перші пробірки кожного ряду, після чого готували подвійні серійні розведення.

Приготування вихідних і робочих розчинів нітрату срібла проводилось за описаною вище методикою із деякими модифікаціями. Для отримання вихідного розчину відбирали 125,4 мг нітрату срібла і розчиняли в 2 мл LB. Даний розчин розводили у співвідношенні 1:10 (по об'єму) і досягали необхідної вихідної концентрації препарату - 6,27 мг/мл. Розчин такої концентрації вносили у пробірки із *C. albicans*. Для впливу на *S. aureus* вміст нітрату срібла знижували до 3,14 мг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - до 1,57 мг/мл. В подальшому у пробірки із 0,5 мл чистого середовища LB вносили аналогічні об'єми вихідних розчинів нітрату срібла і також проводили серію із 12 подвійних серійних розведень.

Добові культури мікроорганізмів отримували шляхом їх культивування у рідкому середовищі LB протягом 18-24 год при 37°C. Із добових культур готували вихідні бактеріальні суспензії за стандартом мутності 0,5 Од по МакФарланду (титр близько $1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Останні розводили у співвідношенні 1:5 (по об'єму) і отримували робочі суспензії мікроорганізмів. В подальшому, у пробірки із приготовленими подвійними розведеннями досліджуваних препаратів вносили по 0,5 мл робочих суспензій. Таким чином, кінцевий об'єм розчину в досліджуваних пробірках сягав 1 мл. При цьому, титр *S. aureus*, *E. coli* і *P. aeruginosa* становив 10^7 КУО/мл, а *C. albicans* - 10^6 КУО/мл.

В дослідних зразках робочі концентрації, із яких розпочинали досліджувати вплив нанокмполиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" на мікроорганізми, становили: для *S. aureus* - 84,1 мг/мл, для *C. albicans* - 42,05 мг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - 21,03 мг/мл. Кінцевими досліджуваними концентраціями нанокмполиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" були: для *S. aureus* - 0,04 мг/мл, для *C. albicans* - 0,02 мг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - 0,01 мг/мл. Вміст чистого срібла у новосинтезованому нанокмполіті срібла «Аргосил» становив 7,61%. Виходячи із цього, діапазон концентрацій чистого срібла у дослідних пробірках із вказаним препаратом для *S. aureus* знаходився в межах від 6400 до 3,13 мкг/мл, для *C. albicans* - від 3200 до 1,56 мкг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - від 1600 до 0,78 мкг/мл.

Робочі концентрації нітрату срібла в дослідних зразках для *C. albicans* становили від 1567,5 до 0,77 мкг/мл, для *S. aureus* - від 783,75 до 0,38 мкг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - від 391,88 до 0,19 мкг/мл. Ступінь чистоти досліджуваного препарату нітрату срібла становив 99,8%, а вміст чистого срібла у даній солі відповідав 63,5%. Виходячи із цього, діапазон концентрацій чистого срібла у дослідних пробірках із нітратом срібла для *C. albicans* знаходився в межах від 998,95 до 0,49 мкг/мл, для *S. aureus* - від 499,47 до 0,24 мкг/мл, а для *E. coli* та *P. aeruginosa* - від 249,74 до 0,12 мкг/мл.

Одночасно із дослідними варіантами в дослідженнях були також використані контрольні зразки. Для отримання позитивних контролів росту мікроорганізмів у пробірки із 0,5 мл LB вносили аналогічні об'єми кожної із досліджуваних культур без додавання препаратів. Як негативні контролі росту мікроорганізмів використовували пробірки із 0,5 мл LB та 0,5 мл робочих суспензій досліджуваних культур (без внесення препаратів), які витримували протягом 24 год. при 4°C. Як негативні контролі чистоти середовища слугували пробірки із 1 мл середовища LB без додавання бактеріальних суспензій і препаратів. Як негативні контролі чистоти препаратів використовували їх подвійні серійні розведення в концентраціях, аналогічних створюваним у дослідних зразках, до яких замість бактеріальних суспензій

добавляли 0,5 мл вихідного LB. Всі описані контролі готували у двох зразках. Інкубування дослідних і контрольних суспензій, за виключенням негативних контролів росту мікроорганізмів, здійснювали на качалці при 37°C та інтенсивному перемішуванні (240 об/хв.) протягом 24 год.

Перед врахуванням результатів перевіряли негативні контролі середовища і препаратів на відсутність росту мікроорганізмів, а позитивні контролі - на наявність росту. Після цього дослідні зразки порівнювали із негативними контролями росту мікроорганізмів, вносячи корективи на наявність мутності у суспензіях відповідно до негативних контролів чистоти препаратів. Для кожного ряду дослідних пробірок визначали першу концентрацію, при якій спостерігалась відсутність видимого росту мікроорганізмів. Дану концентрацію позначали як мінімальну інгібуючу (пригнічуючу, бактеріостатичну) концентрацію (MIC) відповідного препарату по відношенню до досліджуваного виду мікроорганізмів.

Наступним етапом досліджень було визначення мінімальних бактерицидних концентрацій препаратів. Для цього із усіх дослідних зразків з відсутністю видимого росту, а також із усіх контрольних пробірок здійснювали висів 200 мл відповідних суспензій на чашки із щільним середовищем LB. Після рівномірного розподілення кожної із суспензій по поверхні агару і його підсихання, чашки інкубували при 37°C протягом 24 год в термостаті. В подальшому, на щільному середовищі підраховували утворені колонії, які вказували на кількість життєздатних мікроорганізмів у відповідних бактеріальних суспензіях. Даний показник виражали у колонієутворюючих одиницях (КУО). Мінімальну бактерицидну (фунгіцидну) концентрацію відповідного препарату по відношенню до досліджуваних видів мікроорганізмів визначали за першою концентрацією, при якій із внесених на щільне середовище аліквот бактеріальних суспензій виявлявся ріст менше 200 КУО. Вказані показники для *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* позначали як MBC (мінімальна бактерицидна концентрація), а для *C. albicans* - як MFC (мінімальна фунгіцидна концентрація). У висівах із позитивних і негативних контролів росту оцінювали наявність газонів зливного росту, а з негативних контролів середовища і чистоти препаратів (із зразків з максимальними концентраціями препарату) - відсутність росту мікроорганізмів. При дотриманні зазначених умов для контрольних зразків проведений експеримент розглядали як поставлений коректно. Описані дослідження повторювали двократно, отримані результати піддавали статистичній обробці.

Таблиця

Результати експериментальної перевірки активності наноконцентрату "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" по відношенню до досліджуваних мікроорганізмів

Видова належність досліджуваних мікроорганізмів	Мінімальна інгібуюча концентрація MIC (мкг/мл)		Мінімальна бактерицидна/фунгіцидна концентрація MBC/MFC (мкг/мл)	
	препарату	перерахунок на чисте срібло	препарату	перерахунок на чисте срібло
<i>Staphylococcus aureus</i> UKM B-904	330	25	2630	200
<i>Escherichia coli</i> UKM B-906	330	25	660	50
<i>Candida albicans</i> UKMY-1918	660	50	2630	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UKM B-900	2630	200	5260	400
Активність нітрату срібла по відношенню до досліджуваних мікроорганізмів				
Видова належність досліджуваних мікроорганізмів	Мінімальна інгібуюча концентрація MIC (мкг/мл)		Мінімальна бактерицидна/фунгіцидна концентрація MBC/MFC (мкг/мл)	
	препарату	перерахунок на чисте срібло	препарату	перерахунок на чисте срібло
<i>Staphylococcus aureus</i> UKM B-904	73,48	46,76	97,97	62,43
<i>Escherichia coli</i> UKM B-906	12,24	7,8	73,48	46,76
<i>Candida albicans</i> UKMY-1918	73,48	46,76	146,96	93,51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UKM B-900	36,73	23,37	73,48	46,76

Аналізуючи отримані результати по дослідженню антимікробної активності нанокompозиту срібла та нітрату срібла необхідно відмітити, що речовини характеризувались неоднаковим впливом на досліджувані мікроорганізми.

Однак, отримані експериментальні дані підтверджують протимікробні властивості нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла", по відношенню до досліджуваних мікроорганізмів. Результати експериментальних досліджень прогнозують доцільність застосування нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" як протимікробного препарату з сорбційними властивостями.

На базі Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України та кафедри фармакології та клінічної фармакології НМУ ім. О.О.Богомольця проведено вивчення застосування синтезованого нанокompозиту на досліджувані штами мікроорганізмів.

Таким чином, даний спосіб досить точний для оцінки ефективності застосування нанокompозиту "високодисперсного кремнезему-кластерів срібла" і може бути рекомендованим для впровадження в медичну практику.

Література

1. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action / L. Sintubin, B. De Gussemme, P. Van der Meeren et al. // Appl Microbiol Biotechnol. -2011.- Vol.91. - № 1. - P. 153 - 62.
2. Dallas P. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives / P. Dallas, V. Sharma, R. Zboril // Adv Colloid Interface Sci. - 2011. - Vol.166. - P.19 -35.
3. Носач Л.В., Савченко Д.С., Власенко О.М. «Одержання і характеристика кластерів срібла на поверхні нанодисперсного кремнезему». Український науковий-медичний молодіжний ж-л: Київ, 2011. - №4. - С 178.
4. Савченко Д.С. «Розробка матриці-носія для наночастинок срібла». Український науковий-медичний молодіжний ж-л: К., 2011. - №2. - С. 289-290.
5. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material / S. Egger, R.P. Lehmann, M.J. Height et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2009. -75, №9. -P. 2973 -2976.
6. Antimicrobial products - test for antimicrobial activity and efficacy. (JIS Z 2801:2000): JIS Z 2801:2000. - [Чинний від 2000-12-20]. Tokyo: Japanese Standards Association, Japan, 2000. (Japanese Industrial Standard)
7. Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур / Под ред. В.С. Подгорского, О.И. Коцопляк, Е.А. Киприановой, О.Р. Гвоздяк. - К.: Наукова думка, 2007. - 270 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки ефективності застосування нанокompозиту високодисперсного кремнезему та кластерів срібла, що включає проведення мікробіологічних досліджень протимікробних властивостей, який **відрізняється** тим, що оцінюють ефективність композиту по мінімальній інгібуючій концентрації та мінімальній бактерицидній концентрації по відношенню до *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (ATCC 25923), *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922), *Candida albicans* УКМ У-1918 (ATCC 885-653), *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027), отримані результати порівнюють з активністю срібла нітратом і при нормалізації показників оцінюють ефективність препарату.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601