Міністерство охорони здоров’я України
Національний фармацевтичний університет

ПРИСКОКА АНДРІЙ ОЛЕГОВИЧ

УДК 615.015:546.57:541.182.024:612.08

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана на кафедрі фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ)

Науковий керівник: доктор медичних наук, член-кореспондент НАН та НАМН України, професор
ЧЕКМАН Іван Сергійович,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
завідувач кафедри фармакології

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
ЯКОВЛЄВА Лариса Василівна,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри фармакоекономіки

доктор фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
ГОРДІЄНКО Анатолій Дмитрович,
Харківська державна зооветеринарна академія МОН України,
професор кафедри фармакології і токсикології

Захист відбудеться "_17_"_червня_ 2016 р. о _12_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська (Блюхера), 4).

Автореферат розісланий "_13__" _травня_ 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
д. фарм. н., професор Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Нанотехнології надають значні можливості у розробці та впровадженні в медичну практику нових лікарських засобів (ЛЗ) з широким спектром протимікробних властивостей. Одним із пріоритетних напрямків розробки протимікробних препаратів є створення ліків на основі нанометалів (А. А. Елисеев, 2010; V. Mody et al., 2010, A. Mendez, 2011; І.С. Чекман, 2011). Найбільш перспективними є наночастинки таких металів як срібло та мідь із середнім розміром 5–60 нм. Особливий інтерес серед металевих наночастинок становить наноструктуроване срібло (І.С. Чекман та співавт., 2012).

Лікувальні властивості срібла відомі зі стародавніх часів. Однак, перші препарати на основі цього металу були створені лише в другій половині XIX ст. (J. W. Alexander, 2009). З 40-х років XX ст. зацікавленість у них знизилась у зв’язку із появою антибіотиків (K. Dunn, V. Edwards-Jones, 2004). Останнім часом інтерес до цього металу значно зріс. Це пояснюється бурхливим розвитком нанотехнологій та нанофармакології, досягнення яких уможливило створення наночастинок срібла (НЧС) визначеної форми і розміру, а також із появою великої кількості антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів (Г. Р. Яшан и соавт., 2008; И. В. Бабушкина и соавт., 2011; M. K. Rai et al., 2012). За даними світової літератури встановлено, що НЧС більш ефективні по відношенню до патогенних мікроорганізмів в порівнянні з іонізованим сріблом, що робить можливим зменшити вміст срібла в лікарських формах без зниження протимікробного ефекту (W. K. Jung et al., 2008; K. Mijnendonckx et al., 2013).

Наносріблу властиві також інші ефекти, окрім протимікробного, які позитивно впливають на процес одужання – протизапальний та імуномодулюючий (K. C. Bhol, P. J. Shechter, 2007). На відміну від традиційних препаратів на основі іонів срібла, наносрібло дає змогу досягати контрольованого вивільнення іонів металу (M. Oćwieja, Z. Adamczyk, 2013).

У сучасній медичній практиці високу небезпеку становлять септичні ускладнення. За останніми даними, частота випадків сепсису в США становить 3 на 1000 осіб щорічно. У Великій Британії частота летальних випадків у разі септичних ускладнень – понад 30%, вони стають причиною смерті 37000 людей щорічно (J. Soong, N. Soni, 2012). Етіологічна структура септичних захворювань включає грам-позитивні коки, зокрема *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus* та грам-негативні палички: *Escherichia coli, Enterobacter, Pseudomonas aeruginosa*. Особливо небезпечні збудники, які спричиняють септичні ускладнення – це метицилін-резистентні внтурішньогоспітальні штами *Staphylococcus aureus* та мультирезистентні *Pseudomonas aeruginosa* (S. Leaver, I. Mackenzie, 2008). Згідно з класифікацією, зазначеною в звіті Центру з контролю захворюваності США (CDC) за 2013 р., ці мікроорганізми належать до таких, які можуть становити серйозні загрози стосовно резистентності до антибіотиків (C. Lee Ventola, 2015). З огляду на вище зазначене, актуальним є пошук нових лікарських засобів з високою протимікробною активністю.

В Україні розроблено декілька оригінальних методів синтезу НЧС. В Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України під керівництвом д. хім. наук З.Р. Ульберг здійснюється синтез НЧС шляхом хімічного відновлення з розчину

нітрату срібла. Фармакологічні властивості даних НЧС досі не вивчалися ґрунтовно. В плані продовження досліджень кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, а також Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, доцільно провести поглиблене вивчення фізико-хімічних та фармакологічних властивостей НЧС, отриманих за допомогою хімічного синтезу з метою створення ефективного протимікробного засобу з широким спектром дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України в рамках теми «Дослідження фармакологічних, фізико-хімічних, протимікробних властивостей наночастинок срібла, міді, заліза та вуглецю», державний реєстраційний номер 0111U006268, а також теми «Дослідження фармакологічних властивостей наночастинок металів та їх кон'югатів з органічними речовинами», державний реєстраційний номер 0114U000506. Дисертант є співвиконавцем зазначених тем.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – експериментальне обґрунтування доцільності застосування НЧС як протимікробного засобу з метою лікування інфекційних захворювань, в тому числі викликаних антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

Відповідно до мети роботи вирішували такі задачі:

1. Дослідити гостру токсичність НЧС при різних шляхах введення, що забезпечують системний вплив.
2. Вивчити параметри безпеки НЧС: генотоксичність, мутагенність, а також вплив на біохімічні показники сироватки крові експериментальних тварин при одноразовому та повторних введеннях.
3. З'ясувати вплив НЧС за умов внутрішньовенного введення на діяльність серця та показники гемодинаміки кролів.
4. Дослідити протимікробну активність НЧС в умовах *in vitro* по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, Bacillus subtilis* та по відношенню до клінічних антибіотикорезистентних ізолятів мікроорганізмів: *Escherichia coli, Klebsiella ozaenae, Enterobacter aerogenes, Proteus mirabilis, Citrobacter freundii, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*.
5. Визначити протимікробну активність НЧС в експериментальній моделі патології полімікробної генералізованої інфекції *in vivo*, викликаної *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa*.
6. Дослідити протимікробну активність НЧС в експериментальних моделях патології полімікробного абсцесу, викликаного *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa,* а також абсцесів, викликаних *Fusobacterium necrophorum* та *Actinobacillus lignieresii.*

Об'єкт дослідження. Бактеріальні інфекції, у тому числі зумовлені антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

Предмет дослідження. Протимікробна активність та токсикологічна характеристика наночастинок срібла.

Методи дослідження. Фармакологічні, токсикологічні, біохімічні, мікробіологічні, цитологічні, гістологічні, морфологічні, фізико-хімічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведена доцільність внутрішньовенного застосування колоїдного розчину НЧС як протимікробного засобу із широким спектром дії та задовільним профілем безпеки для лікування полімікробної генералізованої інфекції, викликаної *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa*. Встановлено, що НЧС дозами 2, 4 та 8 мг/кг чинять виражену протимікробну дію та зменшують прояви інфекційного процесу: попереджають смертність експериментальних тварин, поліпшують гематологічні показники, зокрема знижують абсолютний та відсотковий вміст моноцитів ($p<0,05$) та покращують морфологічну картину внутрішніх органів – легенів, печінки та нирок експериментальних тварин за морфометричними показниками на 18 – 49% у порівнянні із контролем патології.

Доповнені наукові дані щодо ефективності колоїдного розчину НЧС на моделях локальних абсцесів. Встановлено, що НЧС у колоїдному розчині при зовнішньому застосуванні у концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл протягом п’яти днів виявили вірогідно виражений порівняно з розчином коларголу ($p<0,05$) протимікробний ефект на експериментальній моделі полімікробного абсцесу, викликаного *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa,* а також на експериментальній моделі абсцесу, викликаного *Actinobacillus lignieresii*. На моделі анаеробної інфекції, викликаної *Fusobacterium necrophorum* НЧС виявили терапевтичний ефект в концентрації 7,0 мг/мл, прискорюючи процес загоєння абсцесу за гістологічними ознаками у порівнянні з розчином коларголу.

Розширені уявлення про токсикологічні властивості НЧС. Встановлено, що колоїдний розчин сферичних НЧС розміром 30 нм має різну токсичність при внутрішньовенному та внутрішньоочеревинному шляхах уведення. Виявлено, що при внутрішньоочеревинному введенні НЧС є більш токсичними для самок (LD_{50} – 22,17±2,36 мг/кг – у порівнянні із значенням LD_{50} для самців, що становило 34,53±3,87 мг/кг). Підтверджено, що НЧС у дозі 16 мг/кг за умов одно- та п’ятиразового внутрішньовенного введення мають незначний токсичний вплив, підвищуючи лише активність аланінамінотрансферази (АлАТ) сироватки крові на 13,5% та 6,6% відповідно, а за умов десятиразових внутрішньовенних введень – чинять суттєву токсичну дію, знижуючи концентрацію білірубіну сироватки крові на 37,5% і креатиніну сироватки крові на 26,5%, а також підвищуючи активність АлАТ на 106%. Встановлено, що за умов дробного внутрішньовенного введення кролям *in vivo* у загальних дозах 8,6 мг/кг, 12,9 мг/кг НЧС знижують частоту серцевих скорочень (ЧСС) на 6%, а у дозі 20 мг/кг НЧС – на 14 – 17%., не впливаючи на інші показники діяльності серця та гемодинаміки. Отримані результати засвідчують відсутність токсичного впливу НЧС на серцево-судинну систему за внутрішньовенного шляху введення.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані в дисертаційній роботі експериментальні дані є обґрунтуванням безпеки та виразної протимікробної активності НЧС *in vitro* та *in vivo*. Базуючись на результатах досліджень при

моделюванні полімікробної генералізованої інфекції, викликаної *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa,* запропоновано застосування НЧС як протимікробного засобу для внутрішньовенного введення у дозах 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг (патент України на корисну модель № 99784, 2015 р.).

Окремі фрагменти дисертаційної роботи впроваджені в науково-педагогічний процес кафедри промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (протокол № 11 від 25.04.2016 р.), кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол № 10 від 25.04.2016 р.), кафедри фармакології, патофізіології, клінічної фармакології і клінічної фармації, технології ліків ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ» (протокол № 10 від 18.04.2016 р.), кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету (протокол № 10 від 22.04.2016 р.), кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 11 від 18.04.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником проаналізовано наукову літературу за темою дисертації, визначено мету і завдання досліджень. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, опрацьовано моделі, здійснено експериментальні дослідження, статистичну обробку одержаних даних та оформлено їх у вигляді таблиць і рисунків, сформульовано висновки дисертації. Дослідження впливу НЧС на біохімічні показники сироватки крові тварин та протимікробна активність НЧС по відношенню до тест-штамів *in vitro* проведені за консультативної допомоги канд. біол. наук, старш. наук. співроб. Л.С. Рєзніченко. Протимікробну активність НЧС по відношенню до клінічних ізолятів досліджували на базі ДУ «Інститут урології» НАМН України за консультативної допомоги д-ра мед. наук, проф. А.В. Руденко. Протимікробна активність НЧС у моделях патологій на тваринах вивчалась на базі Інституту ветеринарної медицини НААН України за консультативної допомоги зав. лабораторії анаеробних інфекцій, д-ра вет. наук, проф. В.П. Риженко Гістологічні дослідження зразків при моделюванні у тварин локальних абсцесів проведені на базі Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України за консультативної допомоги канд. біол. наук, старш. наук. співроб. Л.І. Полякової. Висловлюю щиру подяку за надану допомогу науковому керівникові, керівникам та співробітникам лабораторних підрозділів перелічених установ.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі представлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях і симпозіумах: III-му (65) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій Всесвітньому дню здоров’я (Київ, 2012 – 2014 рр.); «YouthNanoBioTech. Молодіжний форум з нанобіотехнологій» (2012 – 2014 рр.); «Нанотехнології у медицині і фармації» (Харків, 2011 р.); IV-му (66) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми

сучасної медицини» (Київ, 2012 р.); науково-практичній конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 2013 р.); 5-th International Conference Nanocon-2013 (Брно, Чеська Республіка, 2013 р.); IV Міжнародній науковій конференції «Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии» (Київ, 2013 р.); засіданні секції «Конструктивні та функціональні наноматеріали для медицини» Наукової ради з нових матеріалів при комітеті Міжнародної асоціації академій наук (Київ, 2013-2014 рр.); V-му (68) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2014 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць: 5 статей, серед яких 3 – у фахових виданнях рекомендованих МОН України, 1 – в зарубіжному виданні, 1 – у зарубіжному електронному науковому виданні; 1 патент України на корисну модель; 9 тез доповідей на з'їздах, конгресах, науково-практичних конференціях.

Обсяг і структура дисертації. Матеріали дисертації викладені на 220 сторінках машинописного тексту. Робота складається із вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», двох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення отриманих даних, висновків, переліку використаних джерел. Покажчик літератури містить 263 джерела, з яких 42 – кирилицею та 221 – латиною. Робота проілюстрована 51 таблицею і 60 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Досліди проведені із використанням 120 самців білих щурів лінії Wistar з масою на момент відбору 180 – 220 г, 56 самок і 56 самців мишей лінії BALB/c з масою тіла на момент відбору 18–22 г, 76 самок і 36 самців білих нелінійних мишей з масою тіла на момент відбору 18–22 г та 30 кролів породи Шиншила обох статей масою тіла 3,0–4,3 кг. Тварин утримували у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця на стандартному раціоні харчування.

Експериментальні дослідження проводили відповідно до етичних норм Directive 86/609/EEC та з дозволу етичної комісії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 72 від 29 травня 2013 р.).

У роботі використали колоїдний розчин сферичних НЧС із середнім розміром 30 нм наданий Інститутом біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України (автори – З.Р. Ульберг, Т.Г. Грузіна, С.М. Дибкова, Л.С. Рєзніченко), препарат порівняння цефтріаксон (Цефтріаксон-БХФЗ порошок для ін'єкцій 1,0 г, виробництва ЗАТ НВЦ "Борщагівський ХФЗ", м.Київ, Україна), а також розчин коларголу 1% (10,0 мг/мл), виготовлений екстемпорально із субстанції коларголу (Аптека №1, КП «Фармація», м. Київ).

Дозу цефтріаксону, яка становила 58,8 мг/кг для щурів розраховували, виходячи із людської дози на масу тіла з урахуванням коефіцієнту видової чутливості (О.В. Стефанов, 2001). Розчин коларголу застосовували у концентрації 1% об'ємом 2 мл (І.С. Чекман та співавт., 2011).

Зображення НЧС отримували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM-1230 («JEOL», Японія). Розмір наночастинок визначали методом

лазерно-кореляційної спектрометрії (Zetasizer-3, «Malvern Instruments Ltd», Великобританія). Спектрофотометричні дослідження проводили на спектрофотометрі Specord M40 (Карл Цейс, Німеччина). Для цих досліджень використали колоїдний розчин НЧС у концентрації 17,28 мкг/мл. Результати відображали графічно у вигляді спектру оптичного поглинання, що являв собою криву залежності оптичного поглинання колоїдного розчину НЧС від довжини хвилі.

Гостру токсичність НЧС за внутрішньоочеревинного введення досліджували на самках та самцях лінії BALB/c. Було обрано внутрішньоочеревинний шлях введення як один із шляхів, що забезпечує системний вплив (О.В. Стефанов, 2001). У дослідження брали 112 самок та самців мишей лінії BALB/c (маса тіла 20±2,0 г), які поділили на 8 груп по 7 особин (7 дослідних груп та одна контрольна). Діапазон доз становив від 15 мг/кг до 45 мг/кг. Гостру токсичність НЧС за внутрішньовенного введення досліджували на самках та самцях білих нелінійних мишей, для дослідження брали 36 самок та 36 самців з масою тіла 20±2 г, віком 2 – 2,5 міс., які були поділені на 6 груп по 6 особин (5 дослідних груп та одна контрольна). Діапазон рівнів доз становив від 50 мг/кг до 150 мг/кг.

Генотоксичність НЧС *in vitro* досліджували на культурі клітин яєчника китайського хом'яка CHO-K1. Обробку еукаріотичних клітин культури CHO-K1 різними концентраціями НЧС здійснювали протягом 4 годин за температури 37°С, після чого визначали ступінь пошкодження ДНК згідно з методикою «ДНК-комет», суть якого полягає у реєстрації відмінностей в електрофоретичній рухливості ДНК і фрагментів ДНК лізованих клітин у постійному електричному полі під впливом досліджуваних наночастинок (А. Д. Дурнев, 2006). Генотоксичність НЧС *in vivo* досліджували на мишах лінії BALB/c із середньою масою тіла 18 – 22 г. Дослідні тварини були розділені на три групи (n=3), яким вводили внутрішньоочеревинно колоїдний розчин НЧС у дозах 39,8 мг/кг, 56,4 мг/кг та 63,1 мг/кг. Тваринам з контрольної групи вводили внутрішньоочеревинно воду для ін'єкцій. Для визначення генотоксичного впливу наночастинок срібла *in vivo* тварин виводили із експерименту через 1 добу та 14 діб після ін'єкцій шляхом декапітації. Генотоксичну дію НЧС визначали на таких внутрішніх органах: печінці, нирках, селезінці, головному мозку, серці та легенях (С.М. Дибкова та співавт., 2010). Мутагенність НЧС вивчали із використанням методу, заснованого на мікроскопічному визначенні та підрахунку хромосомних аберацій типу делецій та транслокацій, наслідком яких є утворення мостів та фрагментів у ана- і телофазі, у корінцях, що проросли з насіння цибулі *Allium cepa* в присутності досліджуваної субстанції (З.П. Паушева, 1988).

Дослідження впливу НЧС на біохімічні показники крові щурів за умов внутрішньовенного введення проведені на 30 самцях щурів лінії Wistar. У першій серії дослідів тварини були розподілені на три групи – контрольну, якій вводили 1 мл фізіологічного розчину, та дві дослідні, котрим одноразово вводили 1,6 мг/кг та 16 мг/кг НЧС. У другій серії дослідів щури також були розподілені на контрольну та дві дослідні групи, яким вводили 1,6 мг/кг та 16 мг/кг НЧС внутрішньовенно один раз на добу протягом 5 діб. Дані дози становили відповідно 1/5 та 1/50 LD_{50} НЧС при внутрішньовенному шляху введення. Для визначення впливу НЧС за умов

десятиразового внутрішньовенного введення 40 самок білих нелінійних мишей розподілили на 4 групи по 10 особин – три дослідні та одну контрольну. Дослідним групам вводили НЧС внутрішньовенно у латеральну вену дозами 1,6 мг/кг, 8 мг/кг, 16 мг/кг десятиразово протягом 28 днів. Дані дози становили відповідно 1/50, 1/10 та 1/5 LD_{50} НЧС при внутрішньовенному шляху введення.

У вказаних вище експериментах визначали біохімічні показники сироватки крові – активність АлАТ, активність аспартатамінотрансферази (АсАТ), білірубін, креатинін (Н.У. Тиц, 1997).

Експерименти щодо впливу НЧС на діяльність серця та стан гемодинаміки у кролів *in vivo* проведено на 30 кролях породи Шиншила масою 3,0 – 3,9 кг. Тварини випадковим чином розподіляли на контрольну (n=10) та дві дослідні групи (n=10). У гострому експерименті (наркоз – уретан 1 г/кг) після катетеризації лівого шлуночка серця та правої стегнової артерії кролів реєстрували головні параметри кардіогемодинаміки – систолічний артеріальний тиск (САТ, мм рт.ст.), частоту серцевих скорочень (ЧСС, уд./хв) та хвилинний об’єм крові (ХОК, мл/хв). Усі показники реєстрували на приладі Hp Viridia Component Monitoring System фірми «Hewlett Packard» (США). Дослідним групам кролів колоїдний розчин НЧС вводили за двома схемами. За першою схемою його вводили внутрішньовенно (крайова вушна вена) частинами по 4,3 мг/кг за металом (триразове введення, кожні 30 хв). Після кожного введення реєстрували показники одразу, а також через 5, 10, 20, 30 хв. За другою схемою вводили одноразово дозу НЧС 20 мг/кг, після чого також реєстрували показники у зазначеному вище порядку. Обрані дози становили частку від LD_{50}, визначеної у експерименті з гострої токсичності за внутрішньовенного введення.

Активність синтезованих НЧС щодо музейних тест-штамів мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144, визначали методом серійних розведень в агарі згідно з МУК 4.2.1890-04 (2004). Мінімальною інгібуючою концентрацією вважали таку, що спричиняє повне пригнічення видимого росту мікроорганізмів.

Дослідження протимікробної активності НЧС *in vitro* на клінічних ізолятах, виконували методом дозованих крапель на твердому поживному середовищі. На чашки Петрі з середовищем визначення (агар Мюлера-Хінтона для бактерій) засівали газоном мікроорганізми – клінічні антибіотикорезистентні ізоляти, виділені у хворих хірургічного профілю із ран, сечі, зіскребів з цервікального каналу, зіву: *Klebsiella ozaenae* 4348, *Citrobacter freundii* 4369, *Escherichia coli* 4358, *Enterobacter aerogenes* 2476, *Proteus mirabilis* 4363, *Staphylococcus aureus* 4312, *Pseudomonas aeruginosa* 283 у концентраціях 10^5 та 10^7 КУО/см^3. Результати обчислювали шляхом вимірювання діаметра зони повної затримки росту тест-культур навколо краплі, що містила НЧС, і виражали в міліметрах (S. Pal, 2007).

Полімікробну генералізовану інфекцію моделювали внутрішньовенним введенням у латеральну хвостову вену щура 0,5 мл суміші суспензій добових культур трьох мікроорганізмів: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus zooepidemicus* у співвідношенні 1:1:1 ($2{,}0\times10^8$ КУО кожного мікроорганізму в 1 см^3 суспензії) (О.В. Стефанов, 2001). Піддослідні тварини –

самці лінії Wistar масою тіла 200±20 г – були розподілені на 7 груп по три тварини: інтактний контроль, контрольні тварини, яким вводили фізіологічний розчин об'ємом 0,5 мл, інфіковані тварини (контроль патології), групу інфікованих тварин, яких лікували препаратом порівняння цефтріаксоном дозою 58,8 мг/кг, і три дослідних групи інфікованих тварин, котрих лікували НЧС трьома дозами – 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг. Досліджувану субстанцію вводили через 24 год. після зараження та протягом наступних 4 днів одноразово, щоденно.

Гематологічні показники крові експериментальних тварин визначали на аналізаторі Mythic 22 (PZ CORMAY S.A., Польща).

Біохімічні показники – активність АлАТ, активність АсАТ, концентрації білірубіну та креатиніну – визначали за попередньо вказаними методиками.

Кров для посівів на стерильність відбирали у ємності типу Еппендорф, попередньо оброблені гепарином. Матеріал висівали на чашки Петрі на м'ясо-пептонний агар. Посіви інкубували за температури 37^0С протягом 24 год. в аеробних умовах, після чого перевіряли на наявність росту мікроорганізмів та підраховували кількість колоній. Отримані результати перераховували в кількість колонієутворюючих одиниць в 1 $см^3$ крові (КУО/$см^3$) (А.С. Лабинская, 1978).

Полімікробний абсцес моделювали шляхом підшкірного введення у ділянку спини між лопатками щурів 1,5 мл суміші суспензій добових культур трьох мікроорганізмів: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus zooepidemicus* у співвідношенні 1:1:1 ($0,5\times10^8$ КУО кожного мікроорганізму в 1 $см^3$ суспензії) з порошком активованого вугілля, масова частка якого в суспензії становила 8%. Абсцес, спричинений *Actinobacillus lignieresii*, моделювали підшкірним введенням у ділянку спини між лопатками щурів 1,5 мл суспензії добової культури *Actinobacillus lignieresii* ($2,0\times10^8$ КУО/$см^3$) з порошком активованого вугілля, масова частка якого в суспензії становила 6%. Абсцес, зумовлений *Fusobacterium necrophorum*, моделювали підшкірним введенням в ділянку лівого стегна суспензії добової культури *Fusobacterium necrophorum* ($2,0\times10^8$ КУО/$см^3$) з порошком активованого вугілля, масова частка якого в суспензії складала 5%. У всіх вказаних вище моделях локальних уражень використали по 20 самців лінії Wistar масою тіла 200±20 г, які були розподілені на 5 груп по чотири тварини: інтактні тварини, інфіковані тварини (контроль патології), групу інфікованих тварин яким розкриті абсцеси промивали препаратом порівняння – розчином коларголу 10,0 мг/мл, а також дві дослідні групи, у яких абсцеси промивали розчинами НЧС у концентрації 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл. Обробку зазначеними вище препаратами проводили протягом 5 діб, кожного дня одноразово фіксованим об'ємом 2 мл (А.С. Лабинская, 1978). Вміст мукопротеїдів у сироватці крові визначали турбідиметричним методом (В.С. Камышников, 2000). Гематологічні показники, а також біохімічні показники – активність АлАТ, активність АсАТ, концентрації білірубіну та креатиніну, визначали за попередньо вказаними методиками.

Результати дослідження оброблені із застосуванням статистичного пакета ліцензійної програми BioStat 2009 v 5.8.4. (виробник – Analyst Soft), а також «Microsoft Excel 2007». Дані представлені середніми значеннями за вибіркою ± стандартна похибка середнього значення. Різницю між показниками вважали

статистично значущою при p < 0,05. Для визначення терапевтичного ефекту НЧС в моделях патологічних станів використовували метод однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Зміни показників вважали статистично значущими з рівнем значущості понад 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення. Дані трансмісійної електронної мікроскопії підтверджують, що НЧС мають сферичну форму (рис. 1).

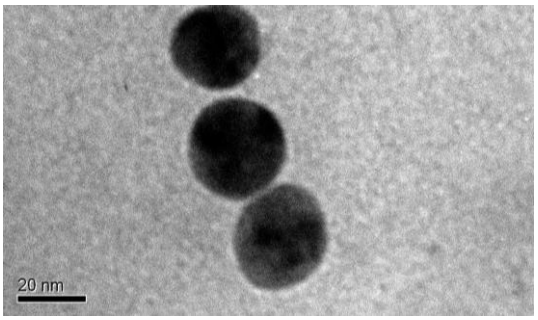

Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення НЧС сферичної форми розміром 30 нм (збільшення х600 000).

Спектрофотометричні дослідження колоїдного розчину НЧС виявили, що максимум поглинання даних НЧС за довжини хвилі 396 нм.

Отриманий спектр поглинання є типовим для НЧС, а довжина хвилі в ділянці 400 нм – характерною для НЧС розміром порядку 30 нм (S. Pal., 2007). Разом з цим, наявність лише одного піку поглинання є додатковим підтвердженням сферичної форми досліджуваних НЧС (R. Brause, 2002).

За результатами лазерно-кореляційної спектроскопії встановлено, що розподіл наночастинок за розміром є одномодальним, отже, в колоїдному розчині відсутні сторонні фракції. Середнє значення розміру НЧС становило 31,8 нм, абсолютна похибка вимірювань становить 0,8 нм.

LD_{50} НЧС для самців лінії BALB/c становить 34,53±3,87 мг/кг, а для самок – 22,17±2,36 мг/кг (p<0,05), розрахована за методом пробіт-аналізу Finney за внутрішньоочеревинного введення. Такий результат дозволяє віднести цю речовину до III класу токсичності «Помірно токсичні сполуки» (Сидоров К.К., 1973). Суттєві відмінності у значеннях LD_{50} для самців та самок свідчать про статевозалежні особливості токсичності та більшу чутливість самок до НЧС за цього шляху введення. Спостереження за поведінкою тварин, а також результати розтину свідчать про виражену подразнювальну дію колоїдного розчину НЧС на органи черевної порожнини за внутрішньоочеревинного введення, що виявлено за макроскопічними ознаками – наявністю гіперемії органів черевної порожнини.

LD_{50} НЧС для самців білих нелінійних мишей становить 83,2±10,93 мг/кг, а для самок – 99,92±11,71 мг/кг, розрахована методом пробіт-аналізу Finney за внутрішньовенного введення. Виявлені значні відмінності у LD_{50} для мишей за різних шляхів введення, що вважаються системними. Менша токсичність НЧС у випадку внутрішньовенного введення порівняно з внутрішньоочеревинним пов’язана з відмінностями в розподілі введених наночастинок в організмі. Отримані дані свідчать про те, що для НЧС внутрішньовенний і внутрішньоочеревинний

шляхи введення не є подібними як за показниками токсичності, так і за проявами інтоксикації, і не можуть бути взаємозамінними.

У дослідженнях генотоксичності встановлена відсутність генотоксичної дії НЧС *in vitro* по відношенню до культури клітин китайського хом'ячка СНО-К1, зокрема, індекс ДНК-комет клітин (0,015±0,001), яких обробляли колоїдним розчином НЧС статистично не відрізнявся від індексу ДНК-комет клітин негативного контролю (0,014±0,001).

Відсутність генотоксичної дії НЧС підтверджена й у експерименті *in vivo:* індекс ДНК-комет клітин усіх внутрішніх органів знаходився на рівні контрольної групи, якій вводили воду для ін'єкцій (0,03±0,01 при введенні НЧС та 0,03±0,01 у контрольній групі).

НЧС не проявляли мутагенної дії по відношенню до клітин *Allium cepa*. Анафазний метод підрахунку хромосомних аберацій в клітинах таких апікальних меристем засвідчив, що в оброблених наночастинками срібла меристемах кількість аберантних клітин становила 0,3%, а в контрольних, не оброблених зразках – 0,1%.

Вплив НЧС на активність АлАТ за умов одноразового внутрішньовенного введення щурам має дозозалежний характер: зі збільшенням дози НЧС зростає активність АлАТ (на 8,6% та 13,5% при введенні НЧС дозами 1,6 мг/кг та 16 мг/кг відповідно), що свідчить про здатність НЧС у високих дозах порушувати функції гепатоцитів (R.M. Green, 2002). НЧС за умов п'ятиразового внутрішньовенного введення щурам також збільшували активність АлАТ (на 6,6% у дозі 16 мг/кг). Вплив НЧС на активність ферментів АлАТ у разі внутрішньовенного введення НЧС мишам дозами 1,6 мг/кг, 8 мг/кг та 16 мг/кг також має дозозалежний характер: зі збільшенням дози статистично значущо зростає активність АлАТ. Зокрема активність АлАТ підвищувалась на 9,8%, 19,8% та 106% при введенні НЧС дозами 1,6 мг/кг, 8 мг/кг, 16 мг/кг відповідно. Значні відмінності значень досліджуваних біохімічних показників сироватки крові у групах, яким вводили НЧС дозою 16 мг/кг, порівняно з іншими групами, а також випадки смертності серед тварин у цій групі свідчать про істотну токсичність НЧС дозою 16 мг/кг (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив НЧС на біохімічні показники сироватки крові мишей за десятиразового внутрішньовенного введення

Показник / Групи тварин та дози	АлАТ, мккат/л	АсАТ, мккат/л	Білірубін загальний, мкмоль/л	Креатинін, мкмоль/л
Контроль (0,5 мл 0,9% розчину натрію хлориду)	0,65±0,02	1,41±0,01	2,00±0,10	43,00±1,99
№1 (1,6 мг/кг)	0,72±0,01*	1,42±0,01	2,05±0,05	44,50±1,49
№2 (8 мг/кг)	0,81±0,22*	1,34±0,12	1,83±0,28	42,00±3,40
№3 (16 мг/кг)	1,34±0,05*	1,03±0,07*	1,27±0,02*	34,00±2,23*

Примітка. * – значення показника дослідної групи статистично значущо відрізняється від групи контролю ($p < 0,05$).

В експерименті *in vivo* із дослідження впливу НЧС на діяльність серця та стан гемодинаміки показано, що дробне внутрішньовенне введення наночастинок

загальними дозами 4,3 мг/кг та 8,6 мг/кг не призводить до зміни показників серцевої діяльності і гемодинаміки. Введення НЧС загальною дозою 12,9 мг/кг знижувало ЧСС на 6% в порівнянні із вих. Внутрішньовенне введення НЧС дозою 20 мг/кг приводило до зниження ЧСС на 14 – 17%, починаючи з 5 хв після введення. В цілому показники діяльності серця та гемодинаміки не виходили за межі фізіологічних коливань для кролів за умов внутрішньовенного введення НЧС, що свідчить про відсутність негативного впливу НЧС.

Проведені дослідження на тест-штамах мікроорганізмів *in vitro* виявили, що мінімальна інгібуюча концентрація щодо тест-штамів мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144 становила 33,46 мкг/мл, за винятком *Bacillus subtilis* ATCC 6633, для якого вона становила 133,8 мкг/мл (табл. 2).

Таблиця 2

Протимікробна активність НЧС по відношенню до еталонних тест-штамів мікроорганізмів

Тест-штами	Засівна доза штамів КУО/см^3	Кінцева концентрація НЧС у середовищі визначення, мкг/мл				Облік росту нативних тест-штамів (контроль)
		133,8	**100,38**	**66,9**	**33,46**	
Staphylococcus aureus MRSA ATCC 43300	10^3	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^4	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^5	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10^3	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^4	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^5	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
Escherichia coli ATCC 2592	10^3	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^4	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^5	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
Shigella sonnei	10^3	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^4	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^5	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
Salmonella typhimurium 144	10^3	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^4	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
	10^5	Ø	Ø	Ø	Ø	++++
Bacillus subtilis ATCC 6633	10^3	Ø	Ø	Ø	+++	++++
	10^4	Ø	Ø	+	+++++	++++
	10^5	Ø	+	+++	+++++	++++

Примітка. Ø – повне інгібування росту мікроорганізмів ; ++++ – інтенсивний ріст мікроорганізмів; +++ – слабко виражене пригнічення росту мікроорганізмів порівняно з контролем; ++ – виражене пригнічення росту мікроорганізмів, порівняно з контролем; + – спостерігається ріст лише одиничних колоній на чашці.

НЧС активні стосовно антибіотикорезистентних клінічних ізолятів в усіх дозах *in vitro*: *Klebsiella ozaenae* 4348, *Citrobacter freundii* 4369, *Escherichia coli* 4358, *Enterobacter aerogenes* 2476, *Proteus mirabilis* 4363, *Staphylococcus aureus* 4312, *Pseudomonas aeruginosa* 283.

Діаметри зон затримки росту для *Pseudomonas aeruginosa,* зокрема, були найбільшими серед усіх досліджуваних при застосуванні 20 мкг НЧС (табл. 3).

Таблиця 3

Протимікробна активність НЧС щодо антибіотикорезистентних клінічних ізолятів

Тест-штами	Засівна доза штамів мікроорганізмів КУО/см^3	Діаметр зон затримки росту клінічних ізолятів мікроорганізмів, мм	
		10 мкг наночастинок срібла у краплі	20 мкг наночастинок срібла у краплі
Escherichia coli 4358	10^5	10	15
	10^7	11	14
Klebsiella ozaenae 4348	10^5	12	15
	10^7	12	15
Enterobacter aerogenes 2476	10^5	10	13
	10^7	10	12
Proteus mirabilis 4363	10^5	13	17
	10^7	13	17
Citrobacter freundii 4369	10^5	10	15
	10^7	11	14
Pseudomonas aeruginosa 283	10^5	14	20
	10^7	12	20
Staphylococcus aureus 4312	10^5	10	13
	10^7	10	13

В експериментальній моделі патології *in vivo* – полімікробній генералізованій інфекції, спричиненій *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa,* показано, що НЧС дозами 2 мг/кг , 4 мг/кг та 8 мг/кг за умов внутрішньовенного введення чинять протимікробний ефект. Зокрема кількість мікроорганізмів, що висівались з крові щурів, яким вводили НЧС дозою 2 мг/кг, була в 135 разів меншою, ніж у тварин, котрих не лікували. В разі застосування НЧС у вищих дозах – 4 мг/кг та 8 мг/кг – мікроорганізми з крові не висівались. Також встановлено, що НЧС дозами 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг за умов внутрішньовенного введення статистично значущо знижують відсотковий вміст та абсолютну кількість моноцитів на тлі полімікробної генералізованої інфекції, а також зменшують клінічні прояви її перебігу.

Проведеними гістологічними дослідженнями встановлено, що введення НЧС дозами 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг в умовах полімікробної генералізованої інфекції, зумовленої *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa* зменшує ураження окремих внутрішніх органів, зокрема печінки, легенів

та нирок. Зокрема, при введенні НЧС у дозах 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг реєстрували: статистично значуще зменшення просвіту центральних вен часточок печінки (на 46,75%, 49,1% та 29,04% відповідно); зменшення площі гепатоцитів як показника гідропічної дистрофії клітин, на тлі введення НЧС дозами 4 мг/кг та 8 мг/кг (на 13,7% та 18,15% відповідно); ядер гепатоцитів – у групі НЧС дозою 8 мг/кг (на 18%). При цьому спостерігалося зменшення вогнищ мікрокрововиливів, а у групі із цефтріаксоном і НЧС дозою 8 мг/кг їх зовсім не реєстрували. Також у групах із введенням НЧС дозами 2 мг/кг, 4 мг/кг спостерігалося відносне зменшення ступеня виразності крововиливів та лейкоцитарного інфільтрату і, відповідно, часткове збереження окремих альвеол легенів. У групах із введенням НЧС дозами 2 мг/кг, 4 мг/кг, 8 мг/кг встановлено часткове збереження канальців нефронів, зменшення дистрофії епітелію звивистих та прямих канальців нирок.

На експериментальній моделі полімікробного абсцесу, спричиненого *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus* та *Pseudomonas aeruginosa* визначено терапевтичний ефект розчинів НЧС у концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл, що застосовувалися зовнішньо. Зокрема, мікробіологічними дослідженнями встановлено, що кількість мікроорганізмів, які висівались із крові тварин, пролікованих НЧС у концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл, були відповідно в 135 та 155 разів меншими, ніж у групі тварин, які не отримували лікування. Гістопатологічні дослідження засвідчили наявність регенераційних процесів в осередку запалення у тварин, рани яких промивали розчинами НЧС (рис. 2).

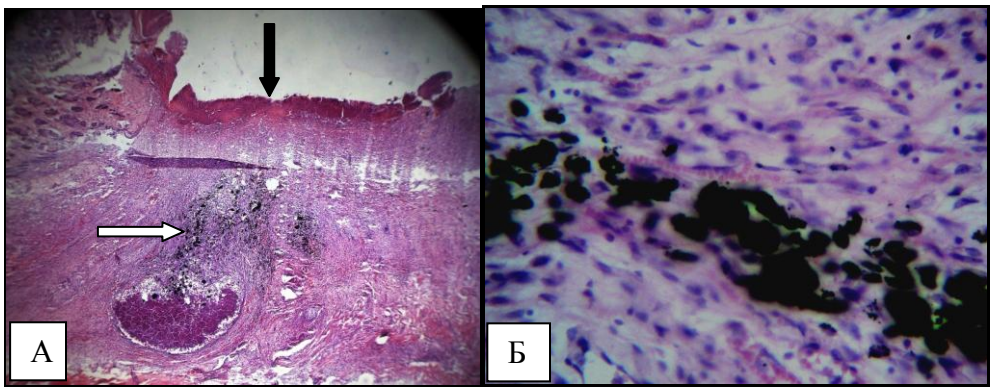

Рис. 2. А. Мікрофотографія гнійно-септичного утворення у тварин з розкритим нелікованим абсцесом, викликаним *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa* у співвідношенні 1:1:1. Струп на місці проколу абсцесу (чорна стрілка), скупчення зруйнованих лейкоцитів (біла стрілка). Гематоксилін-еозин, збільшення ×200. Б – Мікрофотографія тяжа вугільних часточок на межі дерми і гіподерми у тварин з абсцесом після обробки НЧС у концентрації 1,0 мг/мл: лейкоцитів у зоні тяжа не виявлено. Гематоксилін-еозин, ×400.

При інфікуванні бактеріями *Actinobacillus lignieresii* у сформованому некротичному вогнищі знаходили типові утворення у вигляді гранульом із лейкоцитарним вмістом всередині, оточені клітинами лейкоцитів по краях. Встановлено, що розчини НЧС в концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл проявляють більш виражену протимікробну активність у порівнянні з розчином коларголу 10,0 мг/мл. Кількість мікроорганізмів, що висівали, зменшилась відповідно у 80 та

141 раз, тоді як при застосуванні коларголу – у 7,5 рази. Гістопатологічні дослідження підтвердили наявність регенераційних процесів в осередку інфекційного запалення. При застосуванні НЧС в концентрації 7,0 мг/мл у тварин спостерігали руйнування гранульом, спричинених *Actinobacillus lignieresii*. Показано, що досліджувані НЧС у концентрації 7,0 мг/мл у розчині проявляють терапевтичний ефект, що виявлявся у проростанні сполучної тканини та відсутності лейкоцитів в осередку запалення (рис. 3).

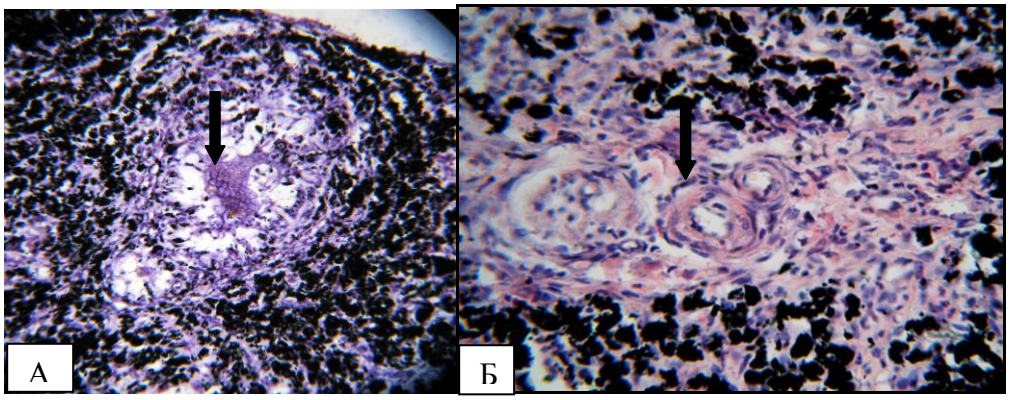

Рис. 3. А. Мікрофотографія абсцесу, спричиненого *Actinobacillus lignieresii*: будова гранульоми: маса загиблих лейкоцитарних клітин усередині (чорна стрілка), оточена лейкоцитами з країв. Забарвлення: гематоксилін-еозин – збільшення ×400. Б – мікрофотографія центральної зони абсцесу, зумовленого *Actinobacillus lignieresii* та застосуванням НЧС в концентрації 7,0 мг/мл: зруйнована гранульома й артеріола в сполучній тканині, сформованій між вугільними частинками. Гематоксилін-еозин, ×400.

Про зниження запальних процесів у тварин, інфікованих бактеріями *Fusobacterium necrophorum*, яких лікували НЧС у розчинах з концентрацією 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл, свідчило статистично значуще зниження вмісту мукопротеїдів сироватки крові. При застосуванні НЧС у концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл вміст мукопротеїдів був нижчим на 7,5% та 9,8% відповідно, ніж у тварин з групи контролю патології, і в той же час статистично не відрізнявся від вмісту мукопротеїдів у групі інтактних тварин. При застосуванні коларголу статистично значущих змін рівня мукопротеїдів в порівнянні з тваринами з групи контролю патології не виявлено.

Отримані результати засвідчують терапевтичну активність НЧС у вигляді колоїдного розчину на моделях локальних абсцесів, викликаних *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa, Actinobacillus lignieresii,* а також *Fusobacterium necrophorum.*

ВИСНОВКИ

Зважаючи на збільшення розповсюдженості антибіотикорезистентних мікроорганізмів та інфекцій, викликаних ними, вибір етіотропної протимікробної терапії стає значно утрудненим, що обумовлює актуальність розробки нових потенційних протимікробних засобів. Серед численних досліджень протимікробних

властивостей НЧС недостатня увага приділялась можливості застосування цих наночастинок для лікування генералізованих інфекцій.

У дисертації наведено нове вирішення актуальної науково-практичної задачі, що полягає в експериментальному обґрунтуванні фармакологічної активності НЧС з метою впровадження їх як протимікробного засобу проти широкого спектру мікроорганізмів, в тому числі й по відношенню до антибіотикорезистентних штамів.

1. У дослідженнях гострої токсичності НЧС у колоїдному розчині встановлено, що LD_{50} НЧС при внутрішньоочеревинному введенні самцям і самкам мишей лінії BALB/c становить 34,53±3,87 мг/кг та 22,17±2,36 мг/кг відповідно, що дозволяє віднести цю речовину до III-го класу токсичності «помірно токсичні сполуки» за класифікацією Сидорова К.К. (1973), а LD_{50} при внутрішньовенному введенні НЧС білим нелінійним мишам для самців та самок становить 83,2±10,93 мг/кг та 99,92±11,71 мг/кг відповідно.

2. Наночастинки срібла не чинять генотоксичної дії *in vitro* та *in vivo* та не проявляють мутагенної дії. НЧС у дозі 16 мг/кг за умов одно- та п’ятиразового внутрішньовенного введення мають незначний токсичний вплив, підвищуючи лише активність АлАТ сироватки крові на 13,5% та 6,6% відповідно, а за умов десятиразових внутрішньовенних введень – чинять суттєву токсичну дію, знижуючи концентрацію білірубіну сироватки крові на 37,5% і креатиніну сироватки крові на 26,5%, а також підвищуючи активність АлАТ на 106%.

3. Показано, що за умов дробного внутрішньовенного введення кролям НЧС у дозах 4,3 мг/кг та 8,6 мг/кг не спричиняють статистично значущих змін параметрів діяльності серця та гемодинаміки. При дробному внутрішньовенному введенні у загальній дозі 12,9 мг/кг, а також при одноразовому введенні у дозі 20 мг/кг НЧС знижують частоту серцевих скорочень на 6% та на 14 – 17% відповідно. В цілому показники діяльності серця та гемодинаміки не виходили за межі фізіологічних коливань для кролів за умов внутрішньовенного введення НЧС, що свідчить про відсутність негативного впливу НЧС на серцево-судинну систему.

4. При вивченні протимікробної активності *in vitro* встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація НЧС по відношенню до музейних тест-штамів мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144 становила 33,46 мкг/мл, за винятком *Bacillus. subtilis* ATCC 6633, для якого вона складала 133,8 мкг/мл. Показано, що НЧС у дозах 10 мкг та 20 мкг пригнічують ріст колоній антибіотикорезистентних клінічних ізолятів *in vitro*: *Klebsiella ozaenae* 4348, *Citrobacter freundii* 4369, *Escherichia coli* 4358, *Enterobacter aerogenes* 2476, *Proteus mirabilis* 4363, *Staphylococcus aureus* 4312, *Pseudomonas aeruginosa* 283. Отримані дані засвідчують широкий спектр протимікробної активності НЧС.

5. На експериментальній моделі патології *in vivo* – полімікробній генералізованій інфекції, викликаній *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa* – показано, що НЧС у дозах 2 мг/кг , 4 мг/кг та 8 мг/кг за умов внутрішньовенного введення чинять протимікробну дію, попереджають смертність експериментальних тварин, зменшують деструктивні зміни легень, печінки та нирок експериментальних тварин за морфометричними показниками на 18 – 49% у порівнянні із контролем патології. НЧС у дозах 2 мг/кг, 4 мг/кг та 8 мг/кг

за умов внутрішньовенного введення покращують гематологічні показники, зокрема статистично значущо (p<0,05) знижують відсоток та абсолютну кількість моноцитів на фоні генералізованої інфекції, а також зменшують візуальні прояви інфекції (зникає пілоерекція, тремор), в той час як препарат-порівняння цефтріаксон у дозі 58,8 мг/кг внутрішньовенно не змінював гематологічні показники до рівня групи інтактних тварин, а також не зменшував інші прояви активності інфекційного процесу.

6. На експериментальній моделі полімікробного абсцесу, викликаного *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa*, НЧС у колоїдному розчині при зовнішньому застосуванні протягом п'яти днів виявили більш виражений протимікробний ефект у порівнянні з розчином коларголу (зменшення кількості мікроорганізмів, що висівалися, у 13,9 та 16 разів при застосуванні колоїдного розчину НЧС у концентраціях1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл відповідно, в порівнянні із коларголом у концентрації 10,0 мг/мл). На експериментальній моделі абсцесу, викликаного *Actinobacillus lignieresii*, кількість мікроорганізмів, що висівалися, при застосуванні НЧС у концентраціях1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл була меншою у 10 та 19 разів відповідно, в порівнянні із коларголом. Терапевтична ефективність колоїдних розчинів НЧС у концентраціях1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл додатково підтверджена гістопатологічними дослідженнями, які засвідчили наявність регенераційних процесів в осередках запалення.

7. На моделі анаеробної інфекції, викликаної *Fusobacterium necrophorum*, НЧС виявили терапевтичний ефект в концентрації 7,0 мг/мл, прискорюючи процес загоєння абсцесу за гістологічними ознаками у порівнянні з розчином коларголу в концентрації 10,0 мг/мл, що проявляється у відсутності лейкоцитів в осередках запалення, проростанні сполучної тканини всередину ділянки абсцесу, а також зниженням вмісту мукопротеїдів при застосуванні НЧС у концентраціях 1,0 мг/мл та 7,0 мг/мл на 7,5% та 9,8% відповідно в порівнянні із контролем патології.

8. Одержані експериментальні дані щодо фармакологічної активності та безпеки наночастинок срібла у вигляді колоїдного розчину свідчать про доцільність створення та розробки НЧС як діючої речовини для створення протимікробного лікарського засобу із широким спектром дії для лікування локальних та генералізованих інфекцій.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження наночастинок срібла за критеріями генотоксичності, мутагенності та впливу на штами-пробіонти шлунково-кишкового тракту людини та тварин / Т.Г. Грузіна, С.М. Дибкова, А.О. Прискока, Л.С. Рєзніченко, З.Р. Ульберг, І.С. Чекман // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 28. – С. 40 – 46. (*Особистий внесок: – проведення експериментальної частини дослідження, обробка отриманих результатів та їхня оцінка, написання статті).*

2. Прискока А.О. Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла за внутрішньоочеревинного введення / А.О. Прискока // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 37 – С. 85 – 90.

3. Прискока А.О. Дослідження гострої токсичності наночастинок срібла при внутрішньовенному введенні / А.О. Прискока // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 39. – С. 38 – 44.
4. Прискока А.О. Влияние наночастиц серебра на биохимические показатели сыворотки крови мышей/ А.О. Прискока // Медицина и образование в Сибири. – 2014. – № 5. – Режим доступу: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1541.
5. Влияние наночастиц серебра на гематологические показатели крови крыс линии Wistar при генерализованной инфекции / А.О. Прискока, Л.С. Резниченко, З.Р. Ульберг, И.С. Чекман // Рецепт. – 2014. – № 6. – С. 51 – 59. (*Особистий внесок: – проведення експериментальної частини дослідження, обробка отриманих результатів та їхня оцінка, написання статті).*
6. Патент України №99784 на корисну модель, МПК A61K 33/00, A61K 33/38 (2006.01). Застосування субстанції наночастинок срібла як протимікробного засобу внутрішньовенного введення в умовах генералізованої інфекції / Л.С. Рєзніченко, А.О. Прискока, З.Р. Ульберг, І.С. Чекман – №u201413860; заявл. 24.12.2014; опубл. 25.06.2015; Бюл. №12/2015. – 7 с. *(Особистий внесок: виконання експерименту, участь в аналізі даних, оформленні патенту).*
7. Silver nanoparticles applicability as antimicrobial substance in the prevention and treatment of septic complications / A. Pryskoka, L. Rieznichenko, A. Rudenko, T. Gruzina, S. Dybkova, I. Chekman, Z. Ulberg // 5-th International Conference Nanocon-2013 October 16th – 18th, 2013. – Brno, Czech Republic. – 2013 – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM) ; 12 см. — Систем. вимоги: Pentium; 32 Mb RAM ; Windows 95, 98, 2000, XP; MS Word 97-2000. (*Особистий внесок: – проведення експериментальної частини дослідження, обробка отриманих результатів та їхня оцінка, написання статті).*
8. Прискока А.О. Наночастинки срібла у фармакології: сучасний стан досліджень / А.О. Прискока // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Нанотехнології у фармації та медицині», м. Харків, 13 – 14 жовтня 2011 р. – Харків, 2011. – С. 172.
9. Прискока А.О. Наночастицы серебра в комбинации с традиционными противомикробными средствами: современное состояние исследований // Материалы докладов Всероссийской научной школы «Превентивная медицина: вызовы XX века», г. Омск, 14 – 15 ноября 2011. – Омск, 2011. – С. 135 – 136.
10. Прискока А.О. Застосування у медичній практиці препаратів на основі наноструктурованого срібла / А.О. Прискока // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції до Всесвітнього дня здоров'я, м. Київ, 7-8 квітня 2011 р. // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – спец. випуск № 2. – С. 286.
11. Прискока А.О. Залежність біологічного ефекту наночастинок срібла від форми та розміру: сучасний стан досліджень / А.О. Прискока // Матеріали міжнародного конгресу «Актуальні проблеми сучасної медицини», м. Київ, 12-14 жовтня 2011 р. // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – № 1 – С. 293.
12. Прискока А.О. Фармакологічні ефекти наночастинок срібла / А.О. Прискока // Матеріали XXVIII всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Ліки-людині», м. Харків, 3 лютого 2011 р. – Харків, 2011. – С. 104 – 105.

13. Прискока А.О. Протимікробні властивості колоїдного розчину наночастинок срібла / А.О. Прискока // Клінічна фармація: 20 років в Україні 21 – 22 березня 2013 р. Матеріали конгресу. – Харків, 2013. – С. 188.
14. Прискока А.О. Дослідження впливу наночастинок срібла на осмотичну резистентність еритроцитів *in vitro* / А.О. Прискока // Тези наукових доповідей Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання внутрішньої медицини» м. Київ 26-27 вересня 2013 р. // Практикуючий лікар. – 2013. – № 3. – С. 38 – 39.
15. Наночастицы серебра как высокоэффективная антимикробная субстанция в профилактике и терапии гнойно-септических осложнений / А.О. Прискока, Л.С. Резниченко, А.В. Руденко, С.Н. Дыбкова, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг, И.С. Чекман // Тезисы IV Международной научной конференции Наноразмерные системы: строение, свойства, технологии НАНСИС-2013, 19 – 22 листопада 2013 р. – Київ, 2013. – С. 475.

АНОТАЦІЯ

Прискока А.О. Експериментальне обґрунтування фармакологічних властивостей наночастинок срібла. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертаційна робота присвячена проблемі фармакотерапії бактеріальних інфекцій, спричинених, зокрема, антибіотикорезистентними штамами.

У роботі теоретично узагальнено й експериментально обґрунтовано новий підхід до розв’язання проблеми лікування сепсису та деяких локальних інфекційних уражень.

Отримані в дисертаційній роботі дані підтверджують наявність протимікробного ефекту наночастинок срібла (НЧС) у колоїдному розчині із середнім розміром 30 нм щодо широкого спектра мікроорганізмів, у тому числі антибіотикорезистентних. Встановлена доцільність застосування НЧС із середнім розміром 30 нм у випадку генералізованої полімікробної інфекції та полімікробного абсцесу, спричинених *Staphylococcus aureus, Streptococcus zooepidemicus, Pseudomonas aeruginosa*, а також абсцесів, зумовлених *Actinobacillus lignieresii* та *Fusobacterium necrophorum*. Це може мати практичне значення в лікуванні сепсису та його ускладнень і локальних уражень, викликаних широким спектром бактеріальних патогенів.

Ключові слова: нанофармакологія, наночастинки срібла, протимікробні властивості, антибіотикорезистентні штами, сепсис, абсцес.

АННОТАЦИЯ

Прискока А.О. Экспериментальное обоснование противомикробных свойств наночастиц серебра. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МОЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена проблеме фармакотерапии бактериальных инфекций, вызванных, в том числе и антибиотико-резистентными штаммами.

В работе теоретически обобщен и экспериментально обоснован новый подход к решению проблемы лечения сепсиса и некоторых локальных инфекционных поражений.

Проведенными исследованиями острой токсичности определено, что LD_{50} исследуемой субстанции наночастиц серебра (НЧС) со средним размером 30 нм при внутрибрюшинном введении самцам и самкам мышей BALB/c составляет 34,53±3,87 мг/кг и 22,17±2,36 мг/кг соответственно, что позволяет отнести это вещество к III классу токсичности «Умеренно токсичные соединения». Существенные различия в значениях LD_{50} НЧС для самцов и самок свидетельствуют о половых особенностях токсичности и большей чувствительности самок к НЧС со средним размером 30 нм при выбранном пути введения. LD_{50} исследуемой субстанции НЧС в условиях внутривенного введения белым нелинейным мышам, для самцов и самок составляет 83,2±10,93 мг/кг и 99,92±11,71 мг/кг соответственно.

Влияние НЧС со средним размером 30 нм на активность ферментов АлАТ и АсАТ в условиях десятикратного введения белым нелинейным мышам в дозах 1,6 мг/кг, 8 мг/кг и 16 мг/кг имеет дозозависимый характер: с увеличением дозы статистически значимо возрастает активность АлАТ, что свидетельствует о гепатотоксическом влиянии НЧС. Наночастицы серебра в дозе 16 мг/кг в условиях десятикратного введения белым нелинейным мышам статистически значимо снижают концентрации билирубина на 37,5% и креатинина на 26,5%. Полученные результаты свидетельствуют о существенной токсичности НЧС в дозе 16 мг/кг.

НЧС со средним размером 30 нм в условиях введения кроликам породы Шиншилла в дозах 4,3 мг/кг и 8,6 мг/кг не влекут статистически значимых изменений исследуемых параметров деятельности сердца и гемодинамики кроликов. Введение НЧС в общей дозе 12,9 мг/кг приводило к статистически значимому снижению частоты сердечных сокращений на 6%. НЧС в дозе 20 мг/кг в условиях введения статистически значимо снижали частоту сердечных сокращений на 14 – 17%.

Минимальная ингибирующая концентрация НЧС по отношению к тест-штаммам микроорганизмов *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144 составляет 33,46 мкг/мл, за исключением *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , для которого она составляет 133,8 мкг/мл.

НЧС подавляют рост колоний антибиотикорезистентных клинических изолятов *in vitro*: *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

НЧС в дозах 2 мг/кг, 4 мг/кг и 8 мг/кг в экспериментальной модели полимикробной генерализованной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa*, оказывают противомикробный эффект: он выражался в снижении количества микробных колоний, которые высевались из крови. НЧС в дозах 2 мг/кг, 4 мг/кг и 8 мг/кг в условиях внутривенного введения статистически значимо снижают содержание и абсолютное

количество моноцитов на фоне генерализованной полимикробной инфекции, а также улучшают клинические проявления ее течения.

НЧС в концентрациях 1,0 мг/мл и 7,0 мг/мл в растворе в условиях наружного применения в течение пяти дней проявляют более выраженный противомикробный эффект по сравнению с раствором колларгола в концентрации 10,0 мг/мл в экспериментальной модели полимикробного абсцесса, вызванного *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

НЧС в концентрациях 1,0 мг/мл и 7,0 мг/мл при наружном применении в течение пяти дней проявляют более выраженную противомикробную активность по сравнению с раствором колларгола в концентрации 10,0 мг/мл в экспериментальной модели абсцесса, вызванного *Actinobacillus lignieresii*.

НЧС в растворе с концентрацией 7,0 мг/мл ускоряют процесс заживления абсцесса в модели анаэробной инфекции, вызванной *Fusobacterium necrophorum* в сравнении с раствором колларгола в концентрации 10,0 мг/мл, что проявляется в отсутствии лейкоцитов в очагах воспаления, прорастании соединительной ткани внутрь участка абсцесса, а также снижением содержания мукопротеидов сыворотки крови до показателей интактных животных.

Ключевые слова: нанофармакология, наночастицы серебра, противомикробные свойства, антибиотикорезистентность, сепсис, абсцесс.

SUMMARY

Pryskoka A.O. Experimental substantiation of pharmacological properties of silver nanoparticles. – The manuscript.

The thesis for getting a degree of Candidate of Pharmaceutical Sciences, specialty 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine – Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to the problem of pharmacotherapy of infections caused by bacteria, including antibiotic-resistant strains.

New approach in solving the problem of the treatment of sepsis and some local infectious lesions was theoretically and experimentally substantiated in this work.

Data obtained in this thesis confirms the antimicrobial effect of silver nanoparticles, a substance with an average particle size of 30 nm, against a wide spectrum of microorganisms, including antibiotic-resistant ones. There was determined a reasonability of silver nanoparticles' with an average size of 30 nm use in treatment of generalized polymicrobial infection and abscess formation caused by *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and abscesses caused by *Actinobacillus lignieresii* and *Fusobacterium necrophorum*. This may have practical implications in the treatment of sepsis and its complications, as well as local lesions, caused by a wide range of bacterial pathogens.

Keywords: nanopharmacology, silver nanoparticles, antimicrobial activity, antimicrobial resistance, sepsis, abscess.