

Использование биопрепаратов

УДК 546.57:544.77.032.1:615.28

Н.А. САМОЙЛОВА^{1,*}, М.А. КРАЮХИНА¹, Д.А. ПОПОВ², Н.М. АНУЧИНА², И.А. ЯМСКОВ¹

¹ФГБУН «Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН» (ИНЭОС), Москва, 119991

²ФГБНУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева», Москва, 121552

e-mail: samoilova.nadezhda@gmail.com

Исследование антимикробных свойств наночастиц серебра, стабилизированных сополимерами малеиновой кислоты

Наночастицы серебра были получены восстановлением соответствующей соли металла NaBH_4 в присутствии диспергирующего агента, а именно, сополимера малеиновой кислоты с N-винилпирролидоном, этиленом или стиролом, а также их амфифильного производного, содержащего октадециламидные лиганды. Коллоиды серебра, идентифицированные с помощью оптической спектроскопии, были синтезированы при содержании ниже их критической концентрации агрегации и молярном соотношении сополимер/ Ag^+ не выше единицы. По данным просвечивающей электронной микроскопии, полученные наночастицы имели форму сферы размером 1–2 нм. Коллоидные растворы полученного наносеребра обладали значительной подавляющей активностью против растительного патогена — гриба *Fusarium oxysporum*, а также в отношении грамотрицательных, грамположительных бактерий и дрожжеподобного гриба. Наночастицы серебра, стабилизированные более гидрофильными сополимерами из числа исследованных, проявляли более высокую антибактериальную и антифунгальную активность.

Ключевые слова: антибактериальная активность, антифунгальная активность, наночастицы серебра, сополимеры малеиновой кислоты.

Антимикробные свойства серебра в виде ионов (солевая форма), наночастиц и массива металла широко известны [1–3]. Наиболее часто в качестве стерилизующего агента используются наночастицы серебра (НЧС). Их применяют при изготовлении пищевых, потребительских товаров и наиболее интенсивно для медицинских целей.

НЧС используют для покрытия медицинских инструментов (скальпелей, игл [4]), ими импрегнируют катетеры, имплантаты, перевязочные материалы и другие изделия медицинского назначения [5, 6]. Популярность НЧС связана с их большей антимикробной активностью и более развитой по сравнению с массивом металла поверхностью, а также

Самойлова Надежда Аркадьевна, Краюхина Мария Александровна, Попов Дмитрий Александрович, Анучина Нелли Михайловна, Ямсков Игорь Александрович.

Список сокращений: ВМК — сополимер малеиновой кислоты с N-винилпирролидоном; ВМК-10 — ВМК, модифицированный октадециламином; КОЕ — колониеобразующая единица; ММ — молекулярная масса; МПК — минимальная подавляющая концентрация; НЧС — наночастицы серебра; ПАВ — поверхностно-активные вещества; ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия; СМК — сополимер малеиновой кислоты со стиролом; СМК-10 — СМК, модифицированный октадециламином; ТСБ — триптиказо-соевый бульон; ЭМК — сополимер малеиновой кислоты с этиленом; ЭМК-10 — ЭМК, модифицированный октадециламином.

* Автор для переписки.

меньшей токсичностью, чем у серебра в солевой форме [3]. В настоящее время вновь возрос интерес к исследованиям, касающимся бактерицидных свойств наносеребра, в связи с распространением микроорганизмов, резистентных к ряду применяемых в клинической практике лекарственных средств.

Несмотря на широкое применение наносеребра и обилие методов получения НЧС — от механо-химических до биотехнологических (с помощью растительных экстрактов и микроорганизмов) активность в области исследований по синтезу, изучению механизма действия и биомедицинскому использованию НЧС не снижается. Антимикробные свойства НЧС в значительной степени зависят от формы, размера НЧ, способа нуклеации, типа стабилизирующей оболочки и степени очистки дисперсий НЧС. Существует множество способов синтеза органо-минеральных золь серебра. Для стабилизации наночастиц металла преимущественно используют либо низкомолекулярные стабилизаторы (в том числе катионные ПАВ, цитрат натрия [7]), либо природные или синтетические полимеры (наиболее распространен поли-N-винилпирролидон [8, 9]). Роль стабилизатора состоит в снижении поверхностной энергии НЧС и предотвращении их агрегации. Строение макромолекул полимера влияет на стабилизирующий эффект и свойства образующейся коллоидной системы.

В настоящей работе исследованы антимикробные свойства полученных ранее [10—12] частиц наносеребра, стабилизированного сополимерами дикарбоновой (малеиновой) кислоты (СМК) или их гидрофобно-модифицированными производными. Наличие в сополимерах структурных единиц и групп, обеспечивающих стерическую и кулоновскую стабилизацию, позволяет получать стабильные, гидрофильные и гомогенные по составу НЧС, которые могут храниться в сухом состоянии.

Цель настоящей работы — исследование *in vitro* влияния НЧС, синтезированных с использованием СМК, на рост растительного патогена — гриба *Fusarium oxysporum*, ряда условно-патогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*), а также дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы и реагенты. Сополимеры малеиновой кислоты получали путем гидролиза (растворения в деионизованной воде с последующим лиофильным высушиванием) чередующихся сополимеров малеинового ангидрида с этиленом (Monsanto, США, ММ = $2,5 \cdot 10^4$), N-винилпирролидоном (ММ = $4 \cdot 10^4$), синтезированным по методике [13], или со стиролом (Стерлитамакский химкомбинат, ММ = $5 \cdot 10^4$). Гидрофобно модифицированные производные указанных сополимеров, содержащие 10% мольных остатков октадециламина, были синтезированы нами ранее [11]. Повиаргол получен от «Технолог СКТБ» (Россия), NaBH_4 и AgNO_3 (все квалификации “ч.д.а.”) были производства “Реахим”, Россия, и использовались без дополнительной очистки. Желатин для клеточных культур произведен фирмой Sigma-Aldrich. В работе использованы штамм *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (INMI, VKM F-140) и штаммы условно-патогенных микроорганизмов, которые приведены в табл. 1.

Получение НЧС. Коллоидные растворы наноразмерного серебра получали боргидридным восстановлением соли серебра при комнатной температуре в присутствии сополимера малеиновой кислоты или его гидрофобно-замещенного производного. Полимерную соль серебра получали путем добавления к свежеприготовленному раствору сополимера (0,01—0,04 осново-моль/л*, рН доводили до 7 или 9 с помощью 1 М NaOH), разбавленному бидистиллированной водой до необходимой концентрации, требуемого (для нужного соотношения реагентов) объема свежеприготовленного раствора AgNO_3 (0,1 М) при интенсивном перемешивании. Через 0,5 ч в раствор полимерной соли при интенсивном перемешивании вносили свежеприготовленный водный раствор NaBH_4 (0,1 М) в 2-кратном мольном избытке по отношению к ионам серебра. Очищенные и высушенные препараты получали после диализа (или ультрафильтрации) реакционной смеси с последующим лиофильным высушиванием (-55° , 0,05 мбар). Содержание серебра в образцах определяли в лаборатории микроанализа ИНЭОС.

* Молярная концентрация повторяющихся звеньев регулярного сополимера.

Таблица 1

Видовой состав тест-микроорганизмов

Микроорганизм	Коллекционные реквизиты
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12903/ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 11954/ATCC 35218
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12973/ATCC 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12697/ATCC 29212
<i>Candida albicans</i>	NCPF3255/ATCC 2091

Методы исследования образцов НЧС. Величину рН среды регистрировали с помощью рН-метра Fisher Scientific 300 403.1 (США).

Оптические спектры регистрировали на спектрофотометре UVIKON-922 фирмы BRD (Германия) при использовании стеклянных кювет с длиной оптического пути 1 см.

ПЭМ-изображения НЧС были получены с помощью микроскопа LEO 912 AB (OMEGA, Karl Zeiss, Германия), снабженного магнитным омега-спектрометром с энергетическим фильтром, интегрированным непосредственно в оптическую систему инструмента. Напряжение ускорения электронов составляло 100 кВ, увеличение — от 80 до 500 000 раз, а разрешение изображения — 0,2—0,34 нм. Для проведения исследований каплю изучаемого раствора помещали на 3-мм медную сетку, покрытую формваром, и высушивали в вакууме. Распределение НЧС по размеру рассчитывали при анализе изображений по крайней мере 100 частиц.

Антифунгальная активность НЧС в отношении гриба р. *Fusarium*. Антифунгальную активность НЧС в отношении *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (растительного патогена) определяли по радиальному росту грибных колоний на твердой питательной среде. Образец НЧС (0,1—10 мг/мл в воде, 3 мл) вводили в раствор желатина (15%), стерилизовали при 110° в течение 20 мин, а затем по 30 мл расплава помещали в стерильные чашки Петри (диаметр 9 см). В центр чашки Петри инокулировали образец *F. oxysporum* (3—5-дневная культура) из колонии, выросшей на картофельно-декстрозном агаре (Whatman, США) диаметром 6 мм. По 3 образца с одинаковой концентрацией НЧС были использованы для исследования параллельно с контрольными образцами, не содержащими НЧС. В качестве критерия

оценки антифунгального действия НЧС на рост гиф грибов во времени было выбрано изменение диаметра грибных колоний на твердой питательной среде. Все чашки Петри с образцами были инкубированы в темноте при 24°. Радиальный рост колонии гриба прослеживали в течение 32 дней.

Определение активности НЧС в отношении условно-патогенных микроорганизмов. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) препаратов наночастиц серебра в отношении исследованных штаммов определяли методом серийных микроразведений в бульоне на планшете по стандартной методике.

Тестирование проводили с использованием стерильного 96-луночного планшета для иммунологических исследований; конечный объем смеси в каждой лунке составлял 0,2 мл. В каждую лунку помещали триптиказо-соевый бульон (ТСБ, HiMedia Laboratories Pvt., Ltd., Индия) по 0,1 мл. Количество лунок определялось необходимым диапазоном разведений; последнюю лунку оставляли для отрицательного контроля. Рабочий раствор (максимальная концентрация наночастиц серебра составляла 2048 мкг/мл) в количестве 0,1 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую лунку, содержащую 0,1 мл бульона. Смесь тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносили 0,1 мл смеси во вторую лунку, уже содержащую 0,1 мл бульона. Процедуру повторяли до приготовления необходимого ряда разведений.

Для инокуляции использовали микробную взвесь тестируемых микроорганизмов, приготовленную на питательном бульоне. По 0,1 мл инокулюма вносили в лунку, содержащую по 0,1 мл соответствующего разведения препарата наночастиц серебра, а также в последнюю лунку с питательным бульоном без исследуемого препарата НЧС (положительный контроль). Конечная концентрация тест-микроорганизма составляла 10⁵ КОЕ/мл. С учетом разведений и объема добавленного инокулюма диапазон исследованных концентраций НЧС составлял от 0,5 до 512 мкг/мл. Приготовленную суспензию проверяли на чистоту путем посева на плотные питательные среды.

Планшеты, закрытые стерильной пленкой, инкубировали при температуре 35° в течение 16—20 ч. Рост культуры в присутствии препарата наночастиц серебра сравнивали с ростом культуры в референтной ячейке без препарата при визуальном контроле (лунки в планшетах просматривали в проходящем свете). МПК определяли по наименьшей концентрации НЧС в ячейке, подавляющей видимый рост тестируемого микроорганизма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика препаратов НЧС

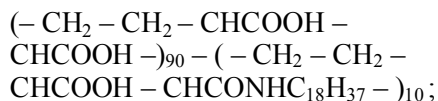
Для получения стабильных коллоидов, содержащих НЧС, использовали сополимеры дикарбоновой (малеиновой) кислоты. Такие сополимеры имеют полианионную природу и регулярное строение гибких линейных цепей: мономерные звенья в макромолекулах строго чередуются. Преимуществом этого класса полимеров является возможность регулирования гидрофобно-гидрофильного баланса макромолекулы за счет как выбора соответствующего сомономера малеиновой кислоты, так и химической модификации одной из двух карбоксильных групп остатка малеиновой кислоты. Соплимеры малеиновой кислоты или коммерчески доступны (в виде сополимеров с малеиновым ангидридом), или легко могут быть получены в условиях радикальной сополимеризации.

В данной работе использовали следующие сополимеры малеиновой кислоты:

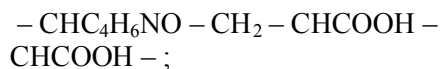
1) сополимер малеиновой кислоты с этиленом (ЭМК):



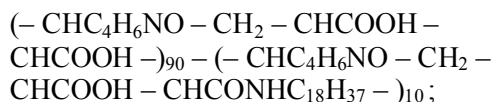
2) сополимер малеиновой кислоты с этиленом, модифицированный октадециламином (10% мольн. *) (ЭМК-10):



3) сополимер малеиновой кислоты с N-винилпирролидоном (ВМК):



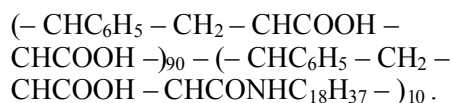
4) сополимер малеиновой кислоты с N-винилпирролидоном, модифицированный октадециламином (10% мольн.) (ВМК-10):



5) сополимер малеиновой кислоты со стиролом (СМК):



6) сополимер малеиновой кислоты со стиролом, модифицированный октадециламином (10% мольн.) (СМК-10):



В получении стабилизированных с помощью сополимеров малеиновой кислоты НЧС можно выделить два этапа: формирование полимерной соли серебра и последующее восстановление ионов серебра в присутствии сополимеров. Первый этап был нами подробно исследован в предыдущей публикации [12]. Для получения НЧС мы выбрали широко применяемый “быстрый” восстановитель — NaBH_4 . Его использование за счет заметной разницы редокс-потенциалов восстановителя (-1,24 В в щелочной среде) и металла (0,7994 В) при значительном избытке первого в системе должно приводить к получению достаточно гомогенных по составу и небольших по размеру частиц. Последнее важно в свете перспективы использования НЧС, поскольку известно, что уменьшение размера частиц приводит к усилению их бактерицидных свойств [14]. Кроме того, этот восстановитель в сравнении с гидразином или гидросиламином обладает невысокой токсичностью. В настоящей работе использовали соотношение сополимер—катион-предшественник не выше 1 (осново-моль/моль) и 2-кратный мольный избыток восстановителя по отношению к катиону металла. При этом не было обнаружено принципиальное различие в размере полученных частиц серебра в сравнении с применением 10-кратного мольного избытка NaBH_4 [15].

Получение стабильных НЧС зависит не только от условий восстановления, но и от свойств полимера-стабилизатора (длины макромолекул, наличия ионогенных групп, гибкости цепи, гидрофобности и т.п.). Все использованные сополимеры малеиновой кислоты — с этиленом (ЭМК), N-винилпирролидоном (ВМК), стиролом (СМК) — и их гидрофобно-замещенные производные, содержащие октадециламидные группы (ЭМК-10, ВМК-10, СМК-10), являются гибкоцепными, имеют сходную длину макромолекул и дифильную природу [11], т.е. содержат в составе цепей гидрофильные и гидрофобные фрагменты (кроме гидрофильного сополимера ВМК, стабилизирующий эффект которого, по-видимому, анало-

* 10% остатков малеиновой кислоты содержат октадециламидный лиганд.

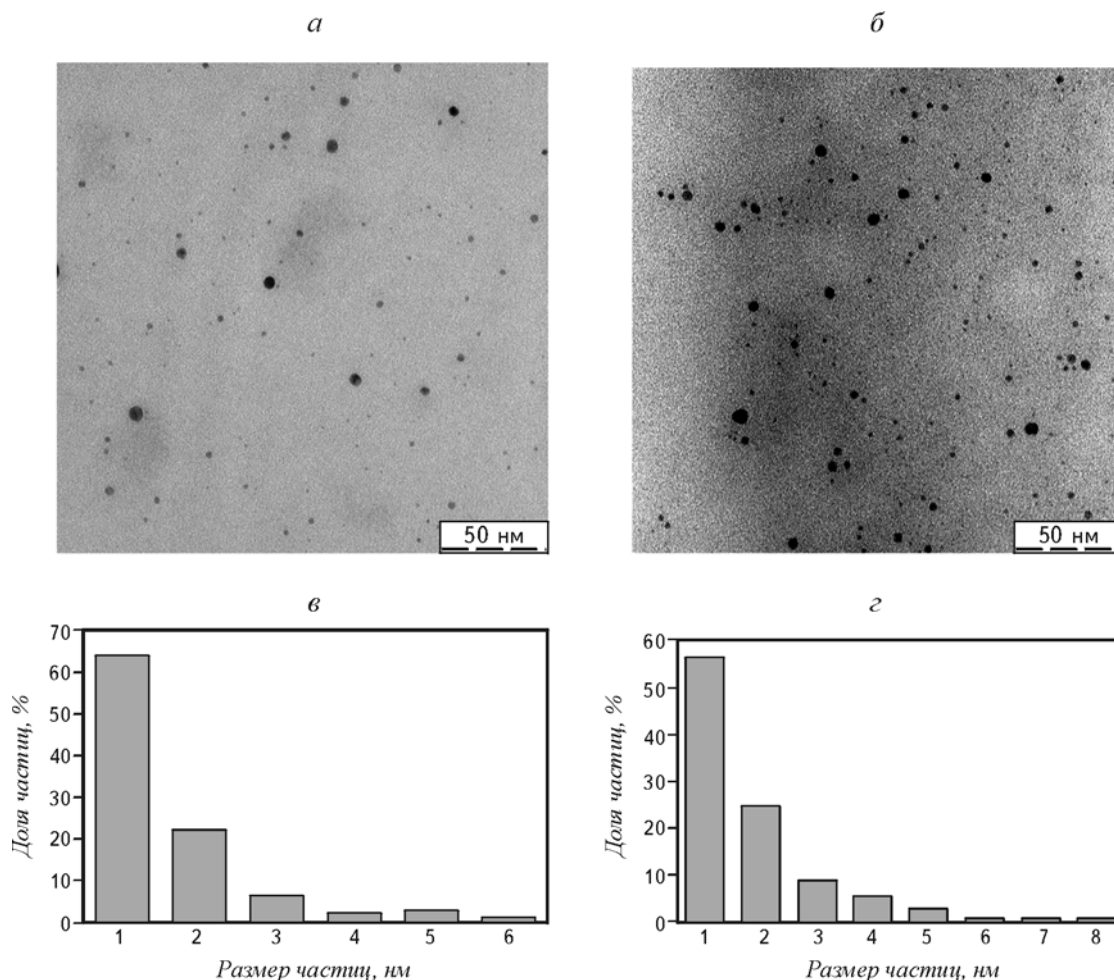


Рис. 1. ПЭМ-микрофотографии (а, б) и гистограммы (в, г) распределения частиц наноконплексов серебра: а, в — ЭМК-10/Ag⁰, б, г — ВМК-10/Ag⁰

гичен эффекту поливинилпирролидона [9] и обусловлен вкладом остатков N-винилпирролидона).

Примеры ПЭМ-изображений и распределения НЧС по размерам в полученном препарате показаны на рис. 1. Форма НЧС во всех исследованных образцах золь близка к сферической. Диаметр частиц серебра несколько увеличивался при переходе от стабилизаторов ЭМК и ЭМК-10 (1,5±0,3 нм) к ВМК и ВМК-10 (1,8±0,3 нм) (см. рис.1) и далее к СМК и СМК-10 (2,0±0,3 нм) (данные не приведены).

На рис. 2 представлены оптические спектры препаратов НЧС. Были сняты спектры образцов, очищенных, лиофильно высушенных и растворенных в деионизованной воде НЧС. Значения максимума пика плазмонного резонанса для всех использованных коллоидов серебра варьировали от 405 до 420 нм при близких значениях диаметра НЧС (табл. 2). Сдвиги плазмонного пика связаны, по-видимому, с природой полимера-стабилизато-

ра, а именно, с разной диэлектрической постоянной вблизи НЧС, зависящей от структуры полимерной оболочки. Характеристики полученных НЧС практически не зависели от концентрации исходных полимеров в реакционной смеси (использованные концентрации не превышали критические значения для мицеллообразования сополимеров) [10] и рН исходного раствора сополимера в выбранном диапазоне.

Антимикробные свойства препаратов НЧС

Действие НЧС на растительный грибной патоген. В качестве объекта для исследования воздействия синтезированных препаратов НЧС на растительные патогены был выбран *F.oxysporum f. sp. radices lycopersici* — паразитический гриб, живущий в почве как сапрофит и вызывающий трахеомикозы — поражение корневой системы у двудольных растений (тыквы, картофеля, томата и др.).

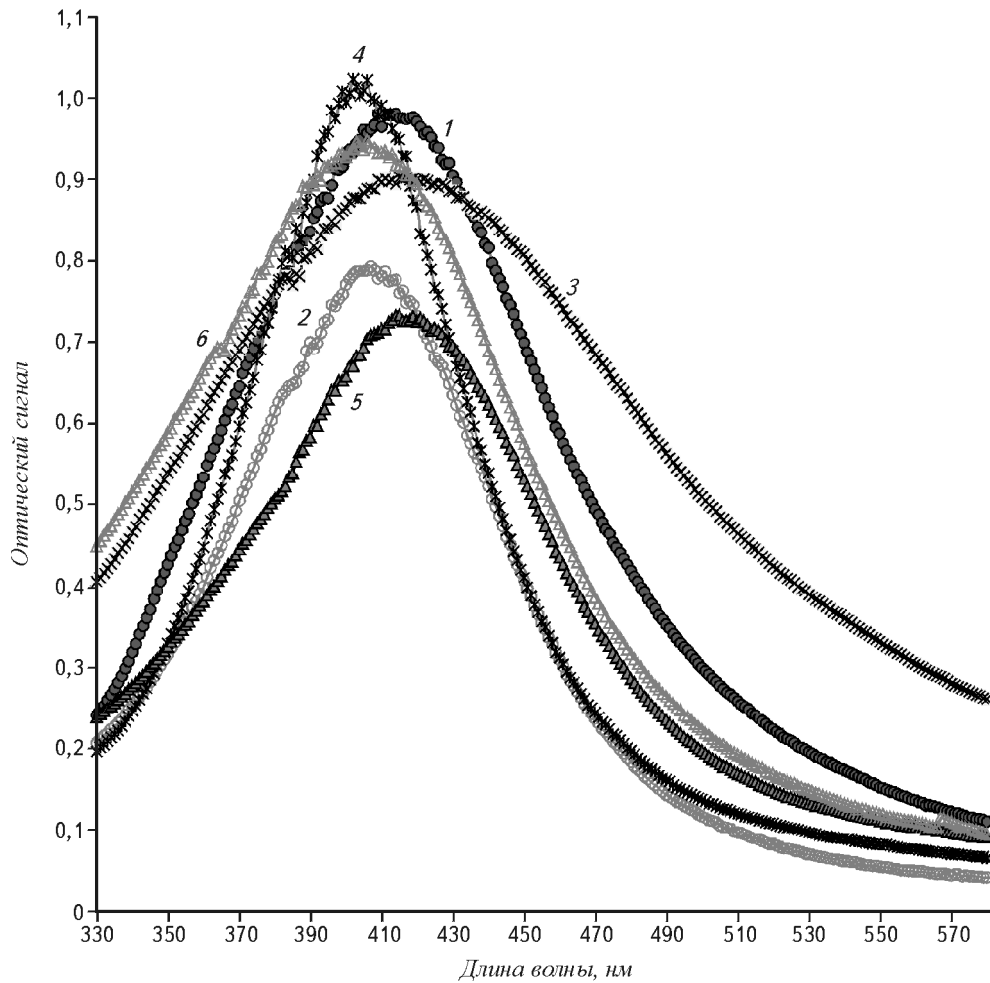


Рис. 2. UV-vis-спектры образцов НЧС: 1 — ЭМК/Ag⁰; 2 — ЭМК-10/Ag⁰; 3 — ВМК/Ag⁰; 4 — ВМК-10/Ag⁰; 5 — СМК/Ag⁰; 6 — СМК-10/Ag⁰

На рис. 3 представлена динамика роста гиф колонии гриба *F. oxysporum* под действием препаратов НЧС в сравнении с фунгицидом Повиарголом, а на рис. 4 показан вид колонии гриба на 6-й день инкубации в присутствии образца ВМК-10/Ag⁰ в сравнении с контролем. Представленные данные относятся к экспериментам, в которых концентрация всех образцов в системе составляла 0,01 мг/мл, и если данные о процентном содержании Ag в образце ВМК-10 (35,8%), приведенные в табл. 2, пересчитать на эту концентрацию, то содержание наносеребра в образцах с сополимерами малеиновой кислоты составит 0,0035 — 0,0036 мг/мл. При увеличении концентрации НЧС на порядок наблюдали практически полное подавление роста растительного патогена (данные не приведены). В качестве образцов для исследования были выбраны препараты НЧС, синтезированные на основе гидрофобно-модифицированных сополимеров малеино-

вой кислоты. Такой выбор был сделан на основании данных, полученных в нашей лаборатории В.Е. Тихоновым с соавт. [15] о большей фунгистатической активности в отношении *F. oxysporum* низкомолекулярного хитозана, модифицированного гидрофобным лигандом — N-[2(3)-(2-додецил)сукциноильным] остатком. Такой эффект может быть объяснен изменением конформации макромолекулы хитозана при его модификации и введением в состав полимера некоторого количества карбоксильных (сукциноильных) групп, что, возможно, облегчало связывание макромолекул со структурными элементами клеточной стенки гриба.

Из данных наших исследований (см. рис. 3) видно, что на протяжении всего времени инкубации наибольшей активностью в подавлении роста колонии *F. oxysporum* обладал препарат наносеребра ВМК-10/Ag⁰, причем рост гиф гриба в этом слу-

Условия получения и свойства образцов наночастиц серебра

Образец	Концентрация* сополимера, осново-моль	pH исходного раствора при синтезе НЧС	λ_{max}^{**} , нм	$\Delta\lambda_{1/2}^{***}$, нм	Содержание серебра в образце, %
ЭМК/Ag ⁰	0,007	7	414	115	8,4
ЭМК-10/Ag ⁰	0,007	9	407	100	33,4
ВМК/Ag ⁰	0,011	7	416	130	18,7
ВМК-10/Ag ⁰	0,011	7	404	115	35,8
СМК/Ag ⁰	0,004	7	420	115	21,4
СМК-10/Ag ⁰	0,004	9	406	110	32,8

* Молярная концентрация повторяющихся звеньев сополимера в реакционной системе.

** Длина волны пика плазмона через 24 ч после приготовления образца.

*** Ширина пика плазмона на полувысоте через 24 ч после приготовления образца.

Полученные препараты НЧС после очистки и лиофильного высушивания могут храниться в течение нескольких лет и после растворения в водной среде не меняют свои оптические свойства.

чае полностью отсутствовал на протяжении 2 нед. Активность полученных препаратов НЧС уменьшается в следующем ряду ВМК-10/Ag⁰→ЭМК-10/Ag⁰→СМК-10/Ag⁰, что, по-видимому, связано с их гидрофильностью, поскольку гидрофильность сомономеров малеиновой кислоты в сополимерах-стабилизаторах также уменьшается в ряду N-винилпирролидон→этилен→стирол. Препарат сравнения Повиаргол проявлял активность примерно на уровне препарата СМК-10/Ag⁰. По-

видимому, помимо гидрофильности на активность препаратов также влияет наличие карбоксильных групп в стабилизирующей полимерной оболочке, которое может способствовать лучшему взаимодействию препарата НЧС с компонентами клеточной стенки гриба (хитином, маннаном, хитозаном и др.). При использовании в качестве среды для инкубирования гриба агарового геля активность препаратов НЧС была заметно ниже, чем на твердой желатин-содержащей питательной среде. Этот эф-

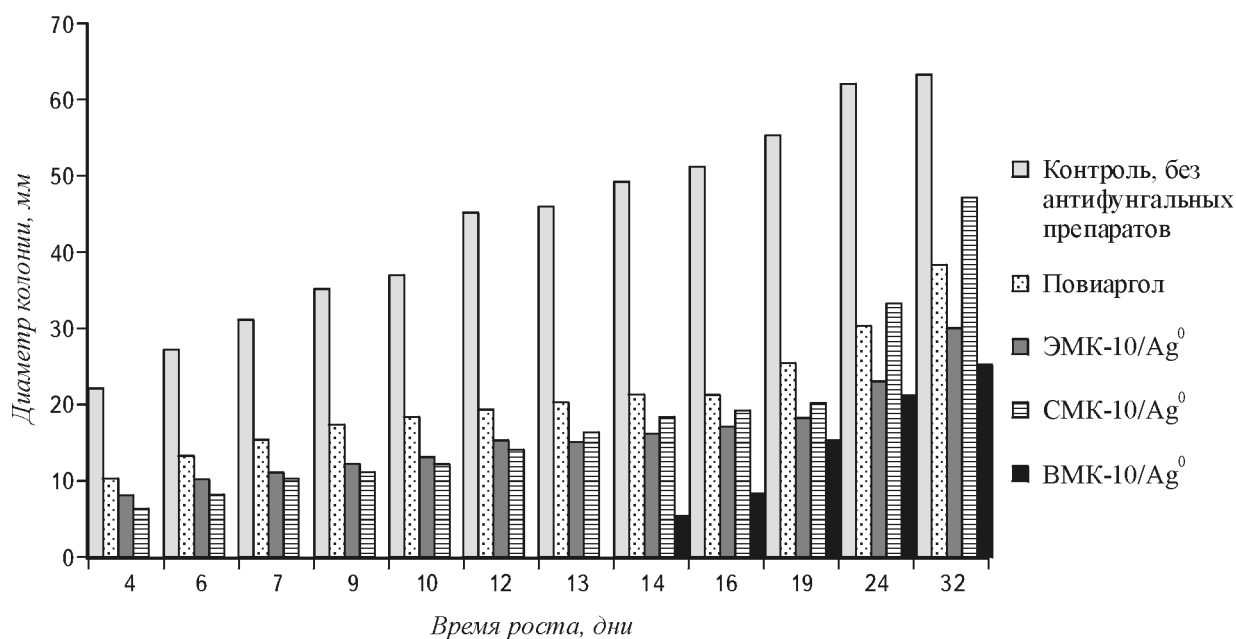


Рис. 3. Динамика роста колонии гриба *F. oxysporum* в присутствии различных антифунгальных препаратов (концентрация 0,01 мг/мл)

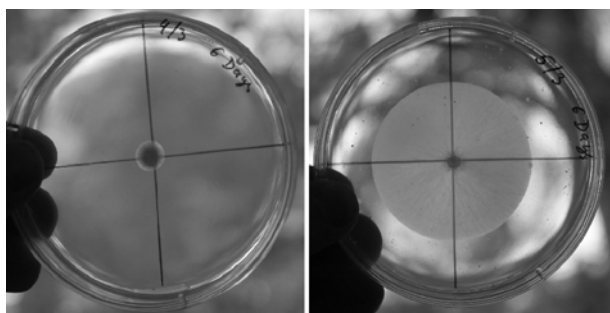


Рис. 4. Вид колоний гриба *F. oxysporum* в чашках Петри на 6-й день инкубации. Слева — контроль (в отсутствие препарата наносеребра), справа — образец BMK-10/Ag⁰

фект может быть объяснен возможностью восстановления полисахаридом катионов серебра, появляющихся на поверхности наночастиц в присутствии кислорода воздуха [16]. Согласно литературным данным, цитотоксический эффект наночастиц в самом деле может быть связан с действием ионов серебра, которые генерируются на поверхности НЧС в присутствии кислорода [17,18], при этом НЧС выступают в качестве депо этих катионов. Так, ионы Ag⁺ на поверхности НЧС могут, в частности, инактивировать клеточные ферменты за счет взаимодействия с тиольными группами белков, нарушать репликацию ДНК и вызывать другие негативные эффекты [19].

Действие НЧС на условно-патогенные микроорганизмы. Данные по активности препаратов наночастиц серебра в отношении ряда грамотрицательных бактерий, грамположительных кокков, а также дрожжеподобного гриба представлены в табл. 3.

Согласно полученным данным, все препараты НЧС проявляли активность в отношении всех исследованных микроорганизмов. Поскольку содержание наносеребра в препаратах различалось (см. табл. 3), сравнение активности синтезированных препаратов НЧС нормировали по этому параметру. Отмечена общая тенденция: более гидрофильные полимеры-стабилизаторы обуславливали большую активность в подавлении роста бактерий. Наиболее эффективным оказался препарат BMK/Ag⁰, для которого значения МПК находились в диапазоне 2—32 мкг/мл. Для возбудителей кандидозов (*Candida albicans*) выявлена обратная зависимость: с ростом гидрофобности оболочки НЧС наблюдалось увеличение антифунгальной активности.

С использованием метода рассеяния света нами было показано ранее [20], что, к примеру, гидрофобно-модифицированное производное сополимера ЭМК-10 проявляет свойства ассоциирующего полиэлектролита, как и ЭМК, но отличается большей степенью агрегации. Большую способность к образованию агрегатов проявляют более гидрофобные из исследованных полимеров, т.е. ЭМК-10 и СМК-10 в составе стабилизирующей оболочки НЧС. Факт влияния интенсивности агрегации НЧС на степень их контакта со стенкой бактерий и активность отмечен в работе [21], где показано, что агрегаты НЧС менее эффективно транспортируются к клеточной стенке микроорганизма. Кроме того, по-видимому, более гидрофильные полимерные оболочки НЧС имеют преимущество в образовании полиэлектролитных комплексов с белковыми компонентами питательной

Таблица 3

Активность препаратов наночастиц серебра в отношении исследованных штаммов (МПК препарата, мкг/мл/содержание Ag, мкг/мл)

Штамм	Препарат					
	BMK/Ag ⁰	BMK-10/Ag ⁰	ЭМК/Ag ⁰	ЭМК-10/Ag ⁰	СМК/Ag ⁰	СМК-10/Ag ⁰
<i>Staphylococcus aureus</i>	8/1,5	32/11,5	32/2,7	128/42,8	128/27,4	128/42,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	32/6,0	64/22,9	32/2,7	128/42,8	56/12,0	128/42,0
<i>Escherichia coli</i>	4/0,7	16/5,8	16/1,3	8/2,6	32/6,8	64/21,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2/0,4	2/0,7	8/0,7	8/2,6	16/3,4	32/10,5
<i>Candida albicans</i>	64/12,0	64/22,9	256/21,5	4/1,3	16/3,4	8/2,6

среды, что способствует их ассимиляции клетками микроорганизмов.

При сравнении воздействия НЧС на различные категории микроорганизмов можно отметить, что, например, грамотрицательные бактерии (неферментирующие бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и энтеробактерии *Escherichia coli*) в целом оказались более чувствительными к воздействию препаратов наносеребра, чем грамположительные (*Staphylococcus aureus*). Это, по-видимому, связано с особенностями строения клеточной стенки микроорганизмов. Известно, что у грамположительных бактерий наружная часть клеточной оболочки состоит из многослойного покрытия пептидогликанов и содержит тейхоевую и липотейхоевую кислоты; внешняя мембрана грамотрицательных бактерий состоит из монослоя пептидогликана (а также липопротеинов, липополисахаридов) и содержит поры [22]. Ранее [23] также было отмечено, что НЧС были более активны в отношении грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *S. tify*), чем грамположительных (*S. aureus*). Из всех исследованных нами штаммов микроорганизмов наибольшее значения МПК были выявлены для *Enterococcus faecalis*, особенно при использовании гидрофильных полимеров-стабилизаторов.

Таким образом, в настоящей работе были получены водорастворимые НЧС, стабилизированные нетоксичными биосовместимыми сополимерами малеиновой кислоты [24], гомогенные по составу и имеющие размеры 1—2 нм. Синтез прост в осуществлении, реакционные условия легко воспроизводимы. Полученные препараты после очистки и высушивания могут сохраняться в сухом виде длительное время без потери свойств. Коллоидные растворы НЧС были активны в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов, а также растительного грибного патогена. Наличие в составе стабилизирующей оболочки НЧС остатков малеиновой кислоты предоставляет возможность получать соли полимеров с различными аминокислотами лекарственными веществами. Остатки малеиновой кислоты легко термически трансформируются в реакционноспособные остатки малеинового ангидрида, что позволяет синтезировать кроме нековалентных также и ковалентные металлополимерные комплексы, например, с рядом специфических лигандов к лектинам патогенов, с гуморальными факторами иммунитета и другими биологически активными соединениями для выявления возможности синергического эффекта.

Получено 26.01.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Chernousova, S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2013. — V.52. — P.1636—1653.
2. Mijndonckx, K. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance / K.Mijndonckx, N.Leys, J.Mahillon, S.Silver, R.V.Houdt // *Biometals.* — 2013. — V. 26. — P.609—621.
3. Chaloupka, K. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical application / K.Chaloupka, Y.Malam, A.M.Seifalian // *Trends Biotechnol.* — 2010. — V.28. — N 11. — P. 580—588.
4. Eby, D.M. Hybrid Antimicrobial Enzyme and Silver Nanoparticle Coatings for Medical Instruments / D.M.Eby, H.R.Luckarift, G.R.Johnson // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2009. — V.1. — N 7. — P. 1553—1560.
5. Galiano, K. Silver segregation and bacterial growth of intraventricular catheters impregnated with silver nanoparticles in cerebrospinal fluid drainages / K.Galiano, C.Pleifer, K.Engelhardt, G.Brossner, P.Lackner, C.Huck, C.Lass-Flord, A.Obwegeser // *Neurol. Res.* — 2008. — V. 30. — N 3. — P. 285—287.
6. Roe, D. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles / D.Roe, B.Karandikar, N.Bonn-Savage, B.Gibbins, J.Roulet // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2008. — V. 61. — N 4. — P. 869 — 876.
7. Дементьева О.В. Коллоидно-химический синтез новых наноструктур на основе серебра с заданным положением локализованного поверхностного плазмонного резонанса / О.В.Дементьева, В.М.Рудой // *Коллоид. журн.* — 2011. — Т.73. — № 6. — С.726—745.
8. Zeng, J. Controlling the shapes of silver nanocrystals with different capping agents / J.Zeng, Y.Zheng, M.Rycenga, J.Tao, Z.-Y.Li, Q.Zhang, Y.Zhu, Y.Xia // *J. Am. Chem. Soc.* — 2010. — V.132. — N 25. — P. 8552—8553.
9. Bonet, F. Study of interaction of ethylene glycol/PVP phase on noble metal powders prepared by polyol process / F.Bonet, K.Tekaia-Elhissien, K.V.Sarethy // *Bull. Mater. Sci.* — 2000. — V.23. — N 3. — P. 165—168.
10. Samoilova, N. Copolymers of Maleic Acid and Their Amphiphilic Derivatives as Stabilizers of Silver Nanoparticles / N.Samoilova, E.Kurskaya, M.Krayukhina, A.Askadsky, I.Yamkov // *J. Phys. Chem. B.* — 2009. — V. 113. — N 11. — P. 3395—3403.
11. Краюхина М.А. Амфифильные сополимеры малеиновой кислоты: синтез и исследование свойств / М.А.Краюхина, С.А.Козыбакова, Н.А.Самойлова, В.Г.Бабак, С.З.Караева, И.А.Ямсков // *Журн. прикл. химии.* — 2007. — Т. 80. — № 7. — С. 1175—1180.
12. Самойлова Н.А. Особенности связывания катионов серебра дифильными сополимерами малеиновой кислоты / Н.А.Самойлова, Е.А.Курская, А.В.Наумкин, З.С.Клеменкова, А.А.Аскадский, И.А.Ямсков // *Прикл. аналит. химия.* — 2011. — № 4. — С. 34—43.

13. Conix, A. Ring Opening in Lactam Polymers / A. Conix, G. Smets // *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* — 1995. — V. 15. — N 79. — P. 221—229.
 14. Marambio-Jones, C. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment / C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek // *J. Nanopart. Res.* — 2010. — V. 12. — N 5. — P. 1531—1551.
 15. Tikhonov, V. E. Bacterial and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives / V.E. Tikhonov, E.A. Stepnova, V.G. Babak, I.A. Yamskov, J. Palma-Guerrero, H.-B. Jansson, L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, D.V. Gerasimenko, I.D. Avdinenko, V.P. Varlamov // *Carbohydrate Polym.* — 2006. — V. 64. — P. 66—72.
 16. Saha, S. Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized Ag and Au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction / S. Saha, A. Pal, S. Kundu, S. Basu, T. Pal // *Langmuir.* — 2010. — V. 26. — N 4. — P. 2885—2893.
 17. Smetana, A. Biocidal Activity of Nanocrystalline Silver Powders and Particles / A. Smetana, K. Klabunde, G. Marchin, C. Sorensen // *Langmuir.* — 2008. — V. 24. — N 14. — P. 7457—7464.
 18. Choi, O. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria / O. Choi, Z. Hu // *Environ. Sci. Technol.* — 2008. — V. 42. — N 12. — P. 4583—4588.
 19. Sondi, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria / I. Sondi, B. Salopek-Sondi // *J. Colloid. Interface Sci.* — 2004. — V. 275. — P. 177—182.
 20. Самойлова Н.А. Стабилизация наночастиц серебра с помощью сополимеров малеиновой кислоты / Н.А. Самойлова, И.В. Благодатских, Е.А. Курская, М.А. Краюхина, О.В. Вышиванная, С.С. Абрамчук, А.А. Аскадский, И.А. Ямсков // *Коллоидн. ж.* — 2013. — Т. 75. — № 4. — С. 1—13.
 21. Lee, S.M. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method / S.M. Lee, L.C. Song, B.C. Lee // *Korean J. Chem. Eng.* — 2010. — V. 27. — N 2. — P. 688—692.
 22. Cabeen, M.T. Bacterial cell shape / M.T. Cabeen, C. Jacobs-Wanger // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — V. 3. — N 8. — P. 601—610.
 23. Shrivastava, S. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles / S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash // *Nanotechnology.* — 2007. — V. 18. — N 22. — P. 225103—225112.
 24. Samoilova, N.A. Polyelectrolyte thromboresistant affinity coatings for modification of devices contacting blood / N.A. Samoilova, M.A. Krayukhina, S.P. Novikova, T.A. Babushkina, I.O. Volkov, L.I. Komarova, L.I. Moukhametova, R.B. Aisina, E.A. Obraztsova, I.V. Yaminsky, I.A. Yamskov // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2007. — V. 82A. — N 3. — P. 589—598.
- N.A. SAMOILOVA^{1,*}, M.A. KRAYUKHINA¹, D.A. POPOV², N.M. ANUCHINA², and I.A. YAMSKOV¹
- ¹The Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russ. Acad. Sci., 119991, Moscow Russia
- ²The Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, 121552, Moscow Russia
- e-mail:* samoilova.nadezhda@gmail.com

Investigation of Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles Stabilized by Maleic Acid Copolymers

Silver nanoparticles have been prepared by the reduction of the corresponding metal salt with NaBH₄ in the presence of appropriate dispersing agents, namely, copolymers of maleic acid with N-vinylpyrrolidone, ethylene and styrene or their amphiphilic derivative containing octadecylamide ligands. The silver colloids identified by optical absorption spectroscopy were synthesized when the copolymer concentrations were lower than their critical aggregation concentrations and copolymer/Ag⁺ molar ratio no greater than a unit. According to the data of transmission electron microscopy, the obtained Ag nanoparticles were spherical-shaped particles 1—2 nm in size. Colloidal solutions of the prepared nanosilver showed a strong inhibiting antifungal activity against a fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* and also Gram-negative, Gram-positive bacteria and yeast. The silver nanoparticles stabilized with more hydrophilic compounds from among the investigated copolymers demonstrated the higher antibacterial and antifungal activity.

Key words: antibacterial activity, antifungal activity, copolymers of maleic acid, silver nanoparticles.

* Author for correspondence.