

УДК: 619:620.3

В. П. РИЖЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор

С. А. НИЧИК, доктор ветеринарних наук

Г. Ф. РИЖЕНКО, кандидат біологічних наук

О. І. ГОРБАТЮК, кандидат ветеринарних наук

В. О. АНДРІЯЩУК, кандидат ветеринарних наук

О. М. ЖОВНІР, Т. М. УХОВСЬКА, О. В. РУДОЙ, С. М. ТЮТЮН

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

Т. Г. ГРУЗИНА, кандидат біологічних наук

Л. С. РЄЗНИЧЕНКО, кандидат біологічних наук

С. М. ДИБКОВА, кандидат біологічних наук

Інститут колоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка, м. Київ

БІОТЕХНОЛОГІЯ НАНОВАКЦИН. ВПЛИВ НАНОПРЕПАРАТУ AgNP НА РОСТОВІ ВЛАСТИВОСТІ ПАТОГЕННИХ ЗБУДНИКІВ

*У статті представлені результати досліджень з вивчення впливу різних робочих концентрацій нанорозмірного срібла на ростові якості аеробних – *E. coli*, *Act. lignieresii* і анаеробних – *F. necrophorum*, *Cl. perfringens* тип А культур за 24 год. культивування та візуалізовані дослідження сорбційних властивостей срібних наночастинок.*

Ключові слова: нанотехнології, нанорозмірні частинки, нанопрепарат срібла AgNP (SNP), сорбція, візуалізація, активізація росту.

Дослідження механізмів взаємодії наночастинок металів із біологічними системами відкриває нові перспективи щодо фундаментального розуміння їх впливу на стан та функціональну активність біологічних клітин, а також дозволяє ефективно застосовувати наночастинок у всіх сферах діяльності людини. Особливо актуальним є їх медичне призначення, в т.ч. і для ветеринарної медицини [1 – 3].

Давно відомо, що сріблу надають особливого значення у боротьбі з бактеріальними та грибовими інфекціями так, як йому притаманні виражені антисептичні властивості. Препарати срібла характеризуються широким спектром антимікробної активності щодо грампозитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних, спороутворюючих й аспорогенних бактерій у вигляді монокультур і мікробних асоціацій, включаючи антибіотикостійкі штами. Властивості наночастинок срібла є ще більш унікальними. Завдяки дослідженням в області новітніх нанотехнологій встановлено, що бактерицидні властивості нанорозмірного срібла можуть багаторазово підсилюватися за рахунок особливостей самих наночастинок. Встановлено, що наночастинок більшості металів володіють каталітичними, адсорбційними та іншими властивостями [4].

Особливо важливо те, що препарати колоїдного срібла стимулюють імунну систему так, як виявлено зростання кількісного вмісту імуноглобулінів класу А, М, G; збільшення абсолютної кількості Т-лімфоцитів (Е-РУК); прискорюються репаративні процеси; здійснюється позитивний вплив на гемопоез, що проявляється у зникненні молодих форм нейтрофілів, збільшенні кількості лімфоцитів,

моноцитів, еритроцитів, вмісту гемоглобіну; активізуються обмінні процеси; знижується ступінь токсичності біологічно активних речовин; зростає антимікробна активність макрофагів і лімфоцитів [5– 7].

Аналіз літературних джерел, в т.ч. зарубіжних, стосовно застосування нанотехнологій у сфері виготовлення вакцинних препаратів вказував на значний дефіцит даних з вивчення таких питань. Тому, нам представляло інтерес вивчити можливість застосування нанорозмірного срібла в технології виготовлення вакцин.

Метою роботи було визначити оптимальну концентрацію нанопрепарату AgNP, яка б максимально стимулювала ріст аеробних та анаеробних патогенів для швидкого накопичення бактеріальної маси за виготовлення вакцинних препаратів та провести візуалізацію сорбційних властивостей наночастинок срібла AgNP.

Матеріал і методи досліджень. Нанопрепарат AgNP придбано в Інституті колоїдної біохімії ім. Ф. Д. Овчаренка НААН України. Нанопрепарат AgNP за типом наноматеріалу представлений наночастинками срібла AgNP (SNP), за властивостями – водна дисперсія нанорозмірністю 30 нм та концентрацією за металом – 80 мкг/мл. Нанопрепарат паспортизований, має негативні тести на генотоксичність, мутагенність та нетоксичний за біохімічними та імунологічними тестами. В паспорті представлені результати постановки тестів із представниками нормальної мікрофлори кишечника *in vitro*.

Для досліджень використано музейні культури аеробних збудників *E. coli* штам «Чернігів – 44», *Act. lignieresii* штам «Малинівський» та анаеробних патогенів *Cl. perfringens* тип А і *F. necrophorum* штам «Світанок». Культури аеробів *E. coli* і *Act. lignieresii* використовували у вигляді змивів добової агарової культури, доведеної до концентрації 1 млрд. м.т./см³ згідно оптичного стандарту каламутності. Добові культури анаеробів *Cl. perfringens* тип А і *F. necrophorum* були вирощені на середовищі Кігта-Тарроці, із яких, після ретельного перемішування, відбирали надосадову культуральну рідину в стерильні пробірки, центрифугували і осаджували бактеріальну масу, відбирали надосадову рідину в дезрозчин, осад клітин культур доводили до концентрації 1 млрд. м.т./см³ за оптичним стандартом каламутності.

Робочі розведення нанопрепарату AgNP проводили послідовно від концентрації 40,0 до 0,16 мкг/мл на МПБ подвійної концентрації в 9 флаконах у флакон № 10 (контроль росту дослідної культури) вносили 40,0 см³ звичайного МПБ, він залишався вільним від нанопрепарату. Після цього в усі флакони вносили по 4,0 см³ 1 млрд. м.т./см³ відповідної культури збудника, ретельно перемішували та культивували за температури 37⁰С упродовж 24 та 48 год. За дослідження культур анаеробів на поверхню середовища із відповідною концентрацією препарату та контрольні наносили шар стерильної вазелінової олії. Оптичну густину культуральних суспензій визначали через 24 год. культивування на спектрофотометрі КФК – 2 при зеленому світлофільтрі, довжині хвилі 590 нм, кюветі 5, проти контролю розчину із відповідними розведеннями нанопрепаратів.

Активність адсорбції наночастинок срібла на поверхні бактеріальних клітин *E. coli* штам «Чернігів – 44», *Act. lignieresii* штам «Малинівський», *Cl. perfringens* тип А, *F. necrophorum* штам «Світанок» за 10 хв. контакту із різними концентраціями нанопрепарату AgNP визначали на електронному мікроскопі. Візуалізацію особливостей контактної взаємодії наночастинок срібла із штамми мікроорганізмів

здійснювали методом трансмісійної електронної мікроскопії («JEOL», Японія). Для отримання електронно-мікроскопічних зображень взаємодії бактеріальних клітин із наночастинками срібла до суспензії клітин у поживному середовищі додавали дисперсію наночастинок срібла та інкубували суміш протягом 10 хв. Далі суміш клітин із наночастинками срібла осаджували центрифугуванням упродовж 5 хв. при 6000 об/хв, осад ресуспендували у 3,0 % розчині глютарового альдегіду на фосфатному буфері. Аліквоти отриманих суспензій наносили на підготовлені бленди, висушували при кімнатній температурі та проводили електронну мікроскопію отриманих препаратів. Препарати не контрастували.

Результати досліджень. Нами проведені дослідження з вивчення впливу різних концентрацій нанопрепарату AgNP на ростові властивості культур *E. coli*, *Act. lignieresii* штам, *Cl. perfringens* тип А, *F. necrophorum* штам «Світанок».

Результати досліджень ростових властивостей патогенів за показниками оптичної густини культуральних суспензій *E. coli* і *Act. lignieresii* при сумісному їх культивуванні із різними концентраціями нанопрепарату AgNP показано на таблиці 1 та рис.2.

Таблиця 1

**Результати досліджень активності культурального росту
E. coli і *Act. lignieresii* за впливу різних концентрацій нанопрепарату
AgNP через 24 год. контакту**

флакона	Концентрація нанопрепарату в культуральній суспензії	Контроль проти культуральної суспензії	Оптична щільність культуральної суспензії, ОО	
			<i>E. coli</i> штам «Чернігів – 44»	<i>Act. lignieresii</i> Штам «Малинівський»
1	2	3	4	5
№ 1	40,0 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 40,0 мкг/мл	1,000	0,530*
№ 2	20,0 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 20,0 мкг/мл	0,950 ~ 1,000	0,640**
№ 3	10,0 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 10,0 мкг/мл	0,900 ~ 1,000	0,700***
№ 4	5,0 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 5,0 мкг/мл	0,940 ~ 1,000	0,800***
№ 5	2,5 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 2,5 мкг/мл	1,000	0,800***
№ 6	1,25 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 1,25 мкг/мл	1,000	0,780 ~ 0,800 ***
№ 7	0,63 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 0,63 мкг/мл	1,000	0,800***
№ 8	0,32 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 0,31 мкг/мл	1,000	0,800***

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
№ 9	0,16 мкг/мл	МПБ із концентрацією нано AgNP 0,16 мкг/мл	1,115*	0,850***
№ 10 (контроль росту дослідної культури)	відсутній	МПБ	0,889	0,385

Примітка. * – $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно із показниками контролю.

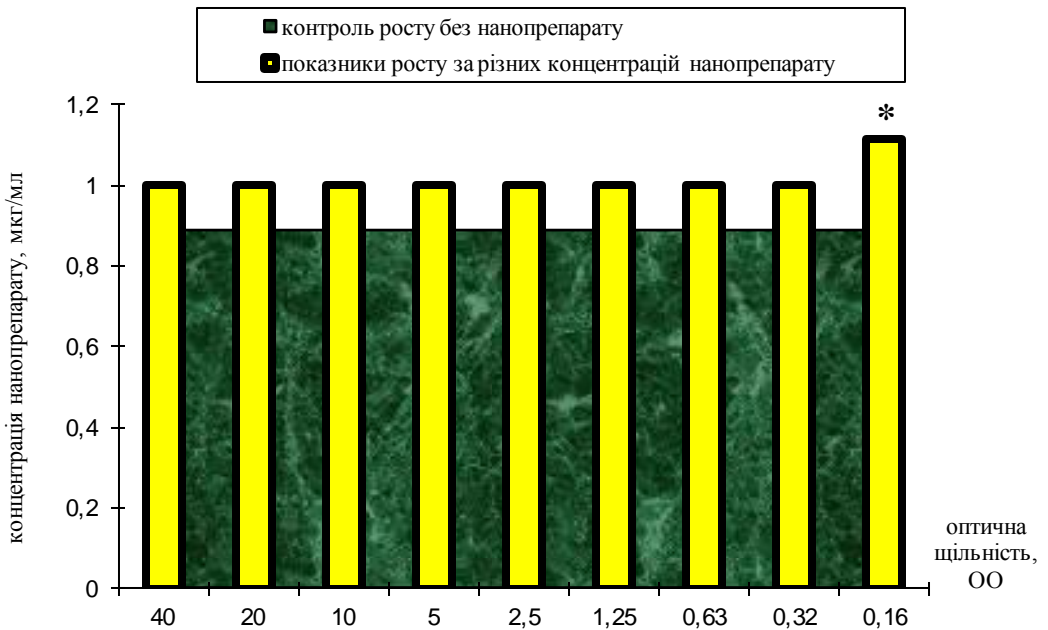


Рис. 1 Показники оптичної щільності за культурального росту *E. coli* під впливом нанопрепарату AgNP

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно із показниками контролю

За результатами досліджень щодо ростової активності *E. coli* штам «Чернігів – 44» за впливу різних концентрацій нанопрепарату AgNP встановлено, що всі робочі концентрації нанорозмірного срібла стимулювали ріст збудника, що засвідчили показники оптичної щільності культуральних суспензій із нанопрепаратом порівняно із контрольним ростом ешерихії без препарату. Проте, концентрація нанопрепарату 0,16 мкг/мл упродовж 24 год. контакту найбільш активно стимулювала ріст культури *E. coli* так, як об'єм бактеріальної маси за показниками оптичної щільності вірогідно зростав на 203 % порівняно із контрольним ростом без наночастинок срібла ($p < 0,05$).

За аналізом результатів досліджень стосовно впливу різних концентрацій нанопрепарату AgNP на ростові якості культури *Act. lignieresii* штаму «Малинівський» виявлено їх високу активізацію, про що свідчили показники оптичної щільності культуральних суспензій (рис. 2).

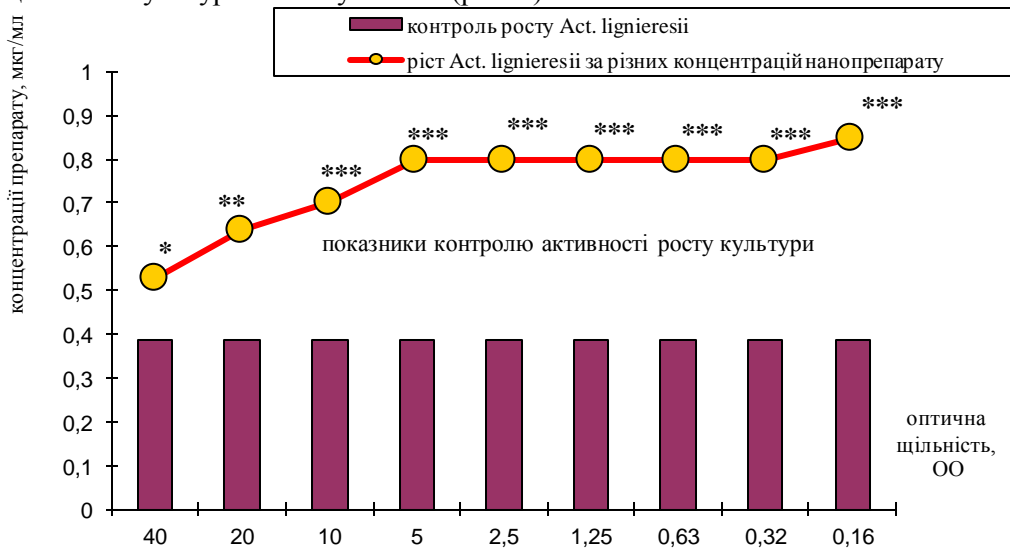


Рис. 2. Показники оптичної щільності культуральної суспензії *Act.*

Примітка. * – $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно із показниками контролю

Навіть в присутності найвищих робочих концентрацій нанопрепарату, останній сприяв вірогідному зростанню об'ємів бактеріальної маси збудника на 27,4 % ($p < 0,01$) порівняно із контрольним ростом без наночастинок срібла. Проте, найактивніший ріст культури збудника спостерігався за його 24 год. культивування при концентрації нанопрепарату AgNP 0,16 мг/мл. При цьому, порівняльні показники оптичної щільності дослідної культури вірогідно зростали в 2,2 рази порівняно із контролем активності росту збудника без додавання нанопрепарату ($p < 0,001$).

Таким чином, із двох досліджених культур патогенних аеробів – *E. coli* штаму «Чернігів – 44» і *Act. lignieresii* штаму «Малинівський» за їх культивування в присутності різних концентрацій нанопрепарату AgNP упродовж 24 год. контакту виявилося, що нанопрепарат срібла більш активно впливав на ростові якості *Act. lignieresii* так, як за його дії об'єм бактеріальної маси збудника вірогідно зростав незалежно від концентрації нанопрепарату AgNP, але найбільшу кількість культуральної маси одержано за концентрації 0,16 мг/мл нанопрепарату порівняно із показниками контрольного росту мікроорганізму ($p < 0,001$). Такі особливості, ймовірно, можна пояснити проаналізувавши результати електронної мікроскопії препаратів, виготовлених із культур збудників *E. coli* і *Act. lignieresii* за 10-и хвилинного контакту із наночастинами препарату.

Порівнюючи властивості культур *E. coli* штаму «Чернігів – 44» і *Act. lignieresii* штаму «Малинівський» за контакту із різними концентраціями нанопрепарату AgNP, за результатами електронної мікроскопії з'ясовано, що дослідна культура *Act. lignieresii* має більш високі сорбційні властивості так, як за однако-

вого терміну контакту із нанопрепаратом сорбція наночастинок AgNP на поверхні клітин значно перевищує такі особливості стосовно *E. coli*.

Аналіз результатів досліджень анаеробних культур показав певні особливості щодо стимуляції росту бактеріальної маси. Так, для обох культур анаеробів – *F. necrophorum* штам «Світанок» і *Cl. perfringens* тип А взаємодія із нанопрепаратом в концентрації 40,0 мкг/мл упродовж 24 год. інгібувала ріст збудників відповідно в 1,7 та 6,2 рази. В присутності концентрації нанопрепарату від 20,0 до 0,31 мкг/мл за 24 год. культивування спостерігалася активізація росту культур анаеробів.

Таблиця 2

Результати досліджень активності культурально росту *F. necrophorum* штам «Світанок» і *Cl. perfringens* тип А за впливу різних концентрацій нанопрепарату AgNP через 24 год контакту

№ фла-кона	Концентрація нанопрепарату в культуральній суспензії	Контроль проти культуральної суспензії	Оптична щільність культуральної суспензії, ОО	
			<i>F. necrophorum</i> штам «Світанок»	<i>Cl. perfringens</i> тип А
1	2	3	4	5
№ 1	40,0 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією нано AgNP 40,0 мкг/мл	0,210	0,090
№ 2	20,0 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 20,0 мкг/мл	0,760 ***	0,830 *
№ 3	10,0 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 10,0 мкг/мл	1,000 ***	0,970 ***
№ 4	5,0 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 5,0 мкг/мл	1,200 ***	1,000 ***
№ 5	2,5 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 2,5 мкг/мл	1,210 ***	1,010 ***
№ 6	1,25 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 1,25 мкг/мл	1,200 ***	1,000 ***
№ 7	0,63 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 0,63 мкг/мл	1,210 ***	1,111 ***
№ 8	0,31 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 0,31 мкг/мл	1,200 ***	1,450 ***

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5
№ 9	0,16 мкг/мл	Середовище Кітта-Тарроці із концентрацією концентрацією нано AgNP 0,16 мкг/мл	1,100 ***	1,000 ***
№ 10 (контроль росту дослідної культури)	відсутній	Середовище Кітта-Тарроці	0,360	0,560

Примітка. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно із показниками контролю

Концентрація 0,16 мкг/мл за культивування обох культур упродовж такого ж терміну часу показала зниження активності росту мікроорганізмів.

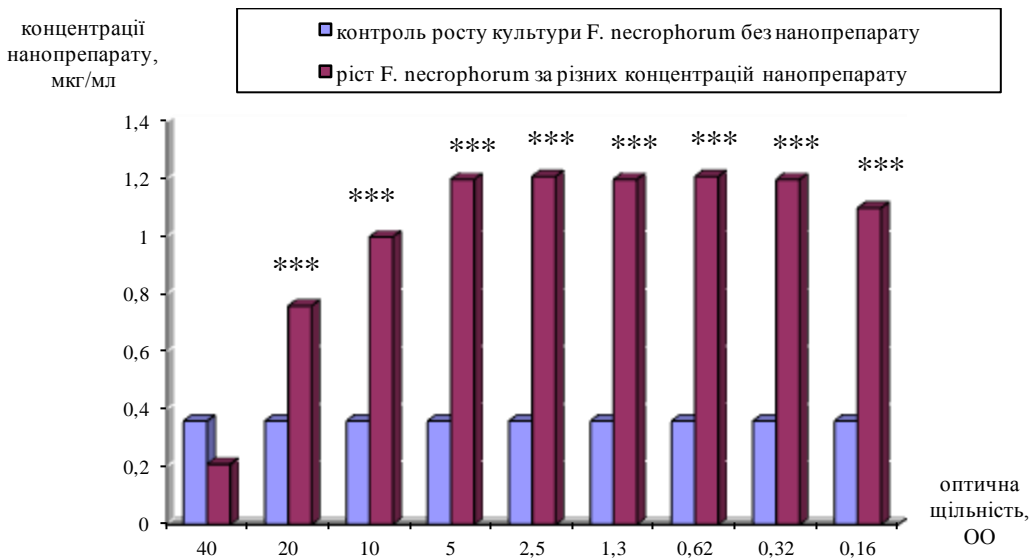


Рис. 3. Показники оптичної щільності культуральної суспензії *F. necrophorum* за застосування нанопрепарату

За результатами досліджень активізація культурального росту і розмноження анаеробних патогенів залежить від концентрації нанопрепарату AgNP, які знаходяться в діапазоні від 20,00 до 0,31 мкг/мл.

Серед означених концентрацій препарату нанорозмірного срібла найбільший приріст бактеріальної маси обох збудників – *F. necrophorum* штаму «Світанок» і *Cl. perfringens* тип А спостерігався за їх культивування із нанопрепаратом в концентрації 0,31 мкг/мл упродовж 24 год., ймовірно, через те, що бактеріальні клітини збудників проявляли помірну сорбцію нанопрепаратів за однаковий термін контакту із препаратом.

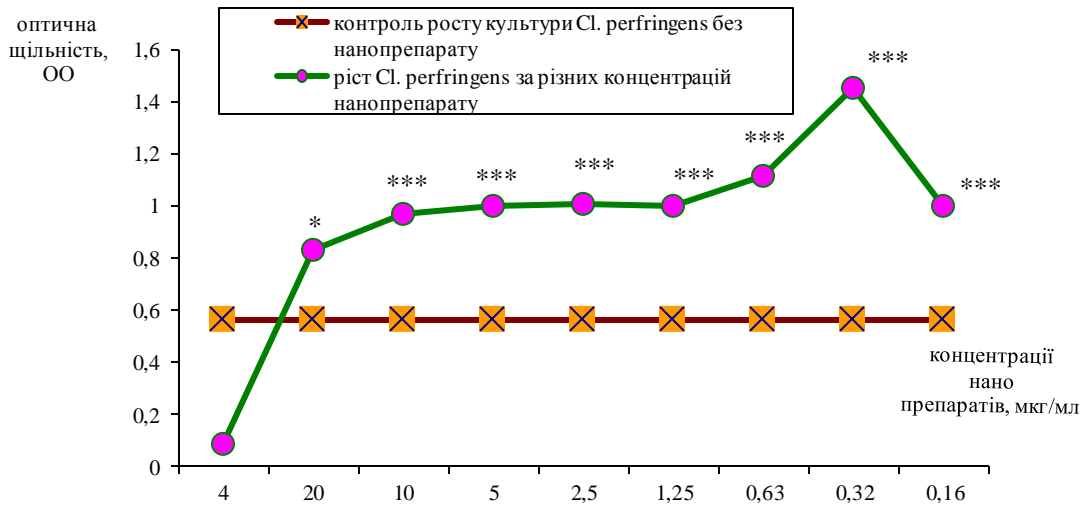


Рис. 4. Показники оптичної щільності культуральної суспензії *Cl. perfringens* за Примітка. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно із показниками контролю культивування із різними концентраціями нанопрепарату

Висновки. 1. Встановлено стимулюючий вплив нанопрепарату AgNP в концентрації 0,16 мкг/мл за 24 год. контакту на ростові властивості ешерихій, свідченням чого є вірогідне зростання об'єму бактеріальної маси відповідно на 20,3 % ($p < 0,01$).

2. Виявлено вірогідне зростання в 2,2 рази за добу кількості бактеріальних клітин збудника *Act. lignieresii* за сумісного культивування в присутності 0,16 мкг/мл препарату нанорозмірного срібла AgNP.

3. Визначено, що сумісне культивування культур анаеробних патогенів *F. necrophorum* *Cl. perfringens* тип А в присутності кінцевих робочих концентрацій нанопрепарату AgNP має особливості, що проявляються стимуляцією культурального росту збудників за концентрації нанопрепарату в діапазоні від 20,0 до 0,31 мкг/мл та вірогідним зростанням об'ємів бактеріальної маси мікроорганізмів – в 1,7 рази для *F. necrophorum* ($p < 0,01$) та 6,2 рази для *Cl. perfringens* тип А ($p < 0,001$).

4. Встановлено, що бактеріальні клітини збудників *E. coli* штам «Чернігів – 44», *Act. lignieresii* штам «Малинівський», *F. necrophorum* штам «Світанок», *Cl. perfringens* тип А за 10 хв. контакту із робочими концентраціями нанорозмірного срібла AgNP володіють різними сорбційними властивостями стосовно нанопрепарату, що, ймовірно, може впливати стимулюючі ростові якості патогенів.

5. Одержані дані засвідчують можливість застосування нанорозмірного препарату срібла AgNP для удосконалення технології виготовлення вакцин для швидкого нарощування бактеріальної маси.

Перспективи подальших досліджень пов'язані із дослідженнями препарату нанорозмірного срібла в високих вихідних концентраціях, вивченням нанопрепаратів інших металів, пов'язаних із клітинним метаболізмом.

Список використаної літератури:

1. Jain K.K. Nanotechnology-based drug delivery for cancer // Technology in Cancer Research & Treatment. – 2005. – 4, No 4. – P. 407 – 416.

2. Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2003. – 55. – P. 403 – 419.
3. Jahnen-Dechent W., Simon U. Function follows form: shape complementarity and nanoparticles toxicity // *Nanomedicine*. – 2008. – 3, No 5. – P. 601 – 603.
4. Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований. / Под ред. М.К. Роко, Р.С. Уильямса и П. Аливисатоса. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 292 с.
5. Ангельский А. А. Лечение больных с остеомиелитами и гнойными ранами с использованием микрохирургической техники и нанопрепаратов серебра / А. А. Ангельский, Т. В. Лавриков, П. П. Родионов и др. // *Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: Сб. матер. науч.-практ. конф.* 11 – 12 окт. 2007 г. – Новосибирск. – Ч. 2. – С. 7–12.
6. Глущенко Н. Н. Ранозаживляющие свойства лекарственных средств на основе наночастиц металлов / Н.Н. Глущенко, Т.А. Байгукалов, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // *Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: Сб. матер. науч.-практ. конф.* 11 – 12 окт. 2007 г. – Новосибирск. – Ч. 2. – С. 76 – 80.
7. В. Б. Борисевич Застосування частинок Ag, Cu, Zn у лікуванні ран / В. Б. Борисевич, Б. В. Борисевич, О.Ф.Петренко та ін. // *Здоров'я і ліки*. – С. 14–15.

БИОТЕХНОЛОГИЯ НАНОВАКЦИН. ВЛИЯНИЕ НАНОПРЕПАРАТА AgNP НА РОСТОВЫЕ КАЧЕСТВА ПАТОГЕННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ / Рыженко В. П., Нычик С. А., Рыженко Г.Ф., Горбатюк О. И., Андрияшук В. А., Грузина Т. Г., Резниченко Л. С., Дыбкова С. Н., Жовнир А. М., Уховская Т.Н., Рудой А.В., Тютюн С.Н.

В статье представлены результаты исследований по изучению влияния разных рабочих концентраций наноразмерного серебра на ростовые качества аэробных – культур в течении 24 час. культивирования, а также визуализированные исследования сорбционных свойств серебряных наночастиц AgNP.

Ключевые слова: нанотехнологии, наноразмерные частицы, нанопрепарат серебра AgNP (SNP), сорбция, визуализация, активизация роста.

BIOTECHNOLOGY NANOVACCINE. EFFECTS ON GROWTH NANOPREPARATIONS AgNP QUALITY PATHOGENS / Rizhenko V. P., Nychik S. A., Rizhenko G. F., Gorbatyuk O. I., Andriyashuk V. A., Gruzina T. G., Reznichenko L. S., Dybkova S. M., Zhovnir A. M., Ukhovska T.N., Rudoy A.V., Tiutun S. N.

The article presents the results of studies on the effect of different working concentrations of nano-sized silver on the growth of aerobic quality - cultures within 24 hours cultivation, as well as research visualized sorption properties of silver nanoparticles AgNP.

Keywords: nanotechnology, nanoscale particles of silver nanopreparat AgNP (SNP), sorption, visualization, activation of growth.

Рецензент – доктор ветеринарных наук **В. Л. Коваленко**

Рукопис надійшов 27. 02. 2014 року.