



Ж. М. Полова

## Дослідження антимікробної активності цитратів срібла та міді з метою розробки фармацевтичних препаратів

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ

**Ключові слова:** антимікробні засоби, срібло, мідь, цитрати.

Швидке формування стійкості мікроорганізмів до антибіотиків спричиняє необхідність пошуку нових, альтернативних антимікробних лікарських засобів. З метою фармацевтичної розробки препаратів вивчили антимікробну активність різних концентрацій розчинів цитрату срібла та міді стандартним методом серійних розведень на тест-штамах мікроорганізмів. Найбільш чутливим до розчину цитрату срібла виявився штам *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 при концентрації срібла у розчині 10 мкг/мл. Чутливість *Staphylococcus aureus* 6538 P проявилась у концентрації срібла 25 мкг/мл. Одержані під час експерименту дані вказують на те, що мінімальна інгібуюча концентрація цитрату срібла (вміст срібла 500 мкг/мл) щодо тест-штаму *Staphylococcus aureus* 6538 P становить 20 мкг/мл; щодо *Escherichia coli* ATCC 25922 – 6,7 мкг/мл, а до *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – 10 мкг/мл відповідно. *Staphylococcus aureus* є чутливим до розчину срібла та міді цитрату в розведенні 1/20 при вмісті металів по 12,5 мкг/мл. Штам *Escherichia coli* ATCC 25922 був чутливим до досліджуваної композиції у розведенні 1/50, що відповідає вмісту металів срібла й міді по 5 мкг/мл. Встановили, що досліджувані розчини виявляють антимікробну дію як до грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів. Це свідчить про перспективність використання сполук срібла та міді у складі антимікробних препаратів м'якої та рідкої форми випуску.

### Исследование антимикробной активности цитратов серебра и меди с целью разработки фармацевтических препаратов

Ж. Н. Полова

Быстрое формирование устойчивости микроорганизмов к антибиотикам вызывает необходимость поиска новых, альтернативных антимикробных лекарственных средств. С целью фармацевтической разработки препаратов изучена антимикробная активность различных концентраций растворов цитрата серебра и меди стандартным методом серийных разведений на тест-штамах микроорганизмов. Наиболее чувствительным к раствору цитрата серебра оказался штам *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 при концентрации серебра в растворе 10 мкг/мл. Чувствительность *Staphylococcus aureus* 6538 P проявилась в концентрации серебра 25 мкг/мл. Полученные в ходе эксперимента данные указывают на то, что минимальная ингибирующая концентрация цитрата серебра (содержание серебра 500 мкг/мл) по отношению к тест-штаму *Staphylococcus aureus* 6538 P составляет 20 мкг/мл, по отношению к *Escherichia coli* ATCC 25922 – 6,7 мкг/мл, а к *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – 10 мкг/мл соответственно. *Staphylococcus aureus* является чувствительным к раствору серебра и меди цитрата в разведении 1/20 при содержании металлов по 12,5 мкг/мл. Штам *Escherichia coli* ATCC 25922 был чувствительным к исследуемой композиции в разведении 1/50, что соответствует содержанию металлов серебра и меди по 5 мкг/мл. Установлено, что исследуемые растворы проявляют выраженное антимикробное действие по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам. Это свидетельствует о перспективности использования соединений серебра и меди в составе антимикробных препаратов мягкой и жидкой формы выпуска.

**Ключевые слова:** антимикробные средства, серебро, медь, цитраты.

*Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики.* – 2016. – № 1 (20). – С. 71–74

### Investigation of antimicrobial activity of silver and copper citrate for the development of pharmaceuticals preparations

Zh. N. Polova

The fast formation of microbial resistance to antibiotics creates necessity of search for new alternative antimicrobial drugs.

**Aim.** To study the specific antimicrobial activity of silver citrate and copper citrate for the purpose of pharmaceutical drugs developing.

**Methods and results.** The antimicrobial activity of silver and copper citrate was studied using the standard method of serial dilutions in culture medium at different test strains of microorganisms.

**Results.** The most sensitive to the silver citrate solution were the strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 at concentration 10 mcg/ml of silver in solution. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* was detected at a concentration of 25 mcg/ml. The results obtained in the experiment indicated that the minimum inhibitory concentration of silver citrate (silver content of 500 mcg/ml) to the test strain of *Staphylococcus aureus* is 20 mcg/ml, relative to *Escherichia coli* ATCC 25922 - 6.7 mcg/ml, and a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 - 10 mcg/ml respectively. *Staphylococcus aureus* is sensitive to solution of silver and copper citrate at 1/20 dilution with content of metal 12.5 mcg/ml. The strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 was sensitive to the test composition at 1/50 dilution, which corresponds to the content of metals (silver and copper) - 5 mcg/ml.

**Conclusions.** Researched solutions demonstrated antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms. The dependence of the antimicrobial action of the exposure time has been found. These researches give the opportunity to choose the dose of the active pharmaceutical ingredient in the composition of antimicrobial liquid and semi-solid dosage forms.

**Key words:** Anti Bacterial Agents, Silver, Copper, Citrates.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2016; № 1 (20): 71–74*

Сучасні принципи лікування та профілактики інфекційних захворювань передбачають інтенсивне використання антибіотиків та антисептиків широкого спектра дії. Однак велике застосування антибактеріальних препаратів для лікування дерматологічних, хірургічних захворювань різної етіології сприяє появі антибіотикорезистентних мікроорганізмів, що призводить до збільшення випадків гнійно-септичних захворювань.

Швидке формування стійкості мікроорганізмів до антибіотиків диктує необхідність пошуку нових, альтернативних антимікробних препаратів. З огляду на це сполуки деяких металів, зокрема карбоксилати срібла та міді, що одержані українськими вченими за оригінальною технологією, є одними з перспективних активних фармацевтичних інгредієнтів для створення нового класу антибактеріальних засобів у різних лікарських формах.

Лікувальні властивості срібла і міді відомі здавна. Протягом тривалого часу вчені різних країн розробляли препарати срібла для медицини: альбаргін, холевал, амарген, таргезин, холевал, аргофлавін, повіаргол, арговіт, аргентум нітрат (ляпіс), срібла сульфадіазин (дермазин, сульфаргін), сульфатіазол срібла (аргосульфан), а також препарати колоїдного срібла – коларгол і протаргол. Фармакологічні властивості препаратів аргентуму визначаються специфічною біологічною активністю іонів  $Ag^+$ , котрі утворюються при дисоціації його сполук. Однією з головних фармакологічних властивостей таких препаратів є антимікробна дія, тому їх використовують переважно як антисептики. Але потужність протимікробної дії сполук срібла залежить від багатьох чинників, таких як спосіб одержання, розмір частинок, концентрації тощо. Сучасний фармацевтичний ринок України обмежений препаратами срібла промислового виробництва лише іноземного походження, що відкриває широкі можливості для розроблення складу й технології вітчизняних срібловмісних лікарських засобів.

Не менш цікавою в науковому аспекті щодо розширення номенклатури антимікробних препаратів є мідь. Мідь – водночас необхідний для життєдіяльності мікроелемент і токсичний важкий метал для багатьох живих клітин. Мідь бере участь у перебігу багатьох важливих метаболічних процесів, а також виявляє значну бактеріостатичну й бактерицидну активність завдяки ушкодженню плазматичних мембран, нуклеїнових кислот і деструкції сульфгідрильних груп протеїнів. Механізм антибактеріальної дії міді та срібла заснований на порушенні структури ДНК мікробної клітини.

Серед препаратів міді відомий сульфат міді (мідний купорос), що тривалий час застосовувався як в'язучий та антисептичний засіб при лікуванні кон'юнктивітів у вигляді очних крапель (0,25% розчин), а також для припікання при трахомі у вигляді очних олівців (смак сульфату міді, нітрату калію, галунів і камфори). 0,25–0,5% розчини використовували при лікуванні гострих запальних захворювань шкіри. Нині відомо, що особливо виражена бактерицидна дія міді проявляється відносно

метицилін-стійкого штаму золотистого стафілокока [3]. Вчені відкрили біоцидні властивості міді відносно бактеріофагів, вірусу бронхіту, вірусу простого герпесу та вірусів грипу [1].

Препарати срібла та міді, на відміну від антибіотиків, не викликають селекцію резистентних штамів мікроорганізмів, що, можливо, хоча б частково вирішить проблему лікування гнійних процесів, котрі викликані антибіотикостійкими мікробними асоціаціями. Саме тому актуальною проблемою є розроблення вітчизняних антимікробних препаратів із цитратами металів.

#### Мета роботи

Вивчити специфічну антимікробну активність розчинів цитрату срібла й міді з метою фармацевтичного розроблення препаратів у вигляді рідких і м'яких лікарських форм.

#### Матеріали і методи дослідження

Антимікробну активність активних фармацевтичних інгредієнтів цитрату срібла та міді вивчали стандартним методом серійних розведень у поживному середовищі – соєво-казеїновому бульйоні на різних тест-штамах мікроорганізмів [2]. Скринінг виконали в лабораторії досліджень хіміко-біологічних чинників (сектор мікробіологічних випробувань) при Українському державному науково-дослідному інституті нанобіотехнологій та ресурсозбереження під керівництвом завідувача лабораторії кандидата медичних наук О. С. Гаврилєнко.

Як тест-штами використовували стандартні типи культур мікроорганізмів, рекомендовані ДФУ для визначення антимікробної дії препаратів, котрі отримали з банку культур НДІ мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України: *Staphylococcus aureus* 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885/6536633.

Штами вирощували при температурі 35–37°C 18–20 годин на скошеному соєво-казеїновому агарі (виробник – Merck KGaA, ФРН; термін придатності – до 15.05.2019), суспендували у фізіологічному розчині (ЗАТ «Інфузія», Україна), доводили концентрацію клітин до  $10^9$  КУО/мл і готували ряд 10-кратних розведень до  $10^3$  КУО/мл, котрі свіжоприготовленими використовували в роботі. Готували суспензії мікроорганізмів і визначали їхню оптичну щільність при 550 нм за допомогою денситометра «Densimat» в одиницях McFarland, перераховуючи показники, що отримали, по таблиці для визначення концентрації бактеріальної суспензії в КУО/мл. Кількість мікроорганізмів у суспензії паралельно підтверджували методом прямого посіву на чашки Петрі зі стерильним поживним середовищем соєво-казеїновим агаром, перераховуючи на КУО/мл. Кожну партію готових поживних середовищ перевіряли на стерильність і ростові властивості.

У роботі використовували розчини: перший – розчин цитрату срібла із вмістом срібла 500 мг/л або 500 мкг/мл, і другий, що складається з цитратів срібла

і міді в рівних пропорціях (із вмістом срібла 250 мг/л або 250 мкг/мл і міді 250 мг/л або 250 мкг/мл). У ряд пробірок вносили тріпказо-соевий бульйон і готували розведення 1/10, 1/25, 1/50, 1/100; усі розчини використовували у свіжоприготовленому вигляді. Розведення досліджуваних розчинів (ДР) розливали по 1,0 мл у пробірки; до кожного з розведень додавали по 0,1 мл суспензії тест-штаму  $10^3$  КУО/мл (із розрахунку відповідного мікробного навантаження, зазвичай  $10^2$  клітин/мл). Інкубація посівів – 24–48 годин при 30–35°C, з наступним підтверджувальним висівом на чашки Петрі з поживним агаром. Облік результатів – візуальна оцінка наявності росту тест-штаму в дослідних пробах у зіставленні з ростом тест-штаму в позитивному контролі (поживне середовище з тест-штамом без ДР). Негативний контроль (поживне середовище без тест-штаму, контроль стерильності поживного середовища), а також контроль стерильності ДР (поживне середовище без тест-штаму, але з додаванням ДР) скрізь був негативний.

### Результати та їх обговорення

Дослідивши протимікробну активність розчину цитрату срібла в різних концентраціях (табл. 1), виявили, що тест-штами відрізняються своєю чутливістю до дії ДР.

Найбільш чутливим до розчину цитрату срібла виявився штам *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 при концентрації срібла в розчині 10 мкг/мл (розведення 1/50). Чутливість *Staphylococcus aureus* 6538 P до ДР срібла проявилась у концентрації срібла 25 мкг/мл (розведення 1/20).

Таблиця 1

### Антимікробна активність розчину цитрату срібла

Розведення	Концентрація срібла, мкг/мл	Наявність росту тест-штаму					
		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
1/1	500	Термін експозиції в годинах					
		24	48	24	48	24	48
1/10	50	-	-	-	-	-	-
1/20	25	-	-	-	-	-	-
1/50	10	+	+	-	-	-	-
1/100	5	+	+	+	+	+	+

Примітки: «+» – наявність росту мікроорганізмів; «-» – відсутність росту мікроорганізмів.

Є дані щодо потенціювання антимікробних властивостей міді у присутності срібла, що вказує на каталітичні властивості срібла щодо міді в біохімічних реакціях, де ці метали виступають як синергісти [4]. Наступний етап досліджень – вивчення антимікробної активності розчину, що являв собою суміш цитрату міді та цитрату срібла із вмістом міді та срібла по 250 мкг/мл (табл. 2).

Проаналізувавши дані, можна зробити висновок, що *Staphylococcus aureus* 6538 P є чутливим до ДР у розведенні 1/20 при вмісті металів (срібла та міді) по 12,5 мкг/мл. Штам *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50)

– чутливий до дії ДР у розведенні 1/50, що відповідає вмісту металів срібла та міді по 5 мкг/мл. Щодо штаму *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, то прослідкували залежність антимікробної активності від часу експозиції. Для підтвердження синергізму дії міді у присутності срібла запланували ширші дослідження з використанням більшої кількості штамів мікроорганізмів.

Таблиця 2

### Антимікробна активність розчину цитрату срібла та цитрату міді (1:1)

Розведення	Концентрація срібла, мкг/мл	Концентрація міді, мкг/мл	Наявність росту тест-штаму					
			<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
1/1	250	250	Термін експозиції в годинах					
			24	48	24	48	24	48
1/10	25	25	-	-	-	-	-	-
1/20	12,5	12,5	-	-	-	-	-	-
1/50	5	5	+	+	-	+	-	-
1/100	2,5	2,5	+	+	+	+	+	+

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації цитрату срібла до *Staphylococcus aureus* 6538 P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 та *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) здійснили випробування з використанням додаткових розведень розчину (табл. 3).

Таблиця 3

### Чутливість досліджуваних штамів мікроорганізмів до розчину цитрату срібла

Розведення	Концентрація срібла, мкг/мл	Наявність росту тест-штаму					
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
1/1	500	Термін експозиції в годинах					
		24	48	24	48	24	48
1/10	50	-	-	-	-	-	-
1/20	25	-	-	-	-	-	-
1/25	20	-	-	-	-	-	-
1/40	12,5	-	-	-	-	+	+
1/50	10	-	-	-	-	+	+
1/75	6,7	+	+	-	-	+	+
1/100	5	+	+	+	+	+	+

Дані дають підставу стверджувати, що мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) цитрату срібла (вміст срібла 500 мкг/мл) щодо тест-штаму *Staphylococcus aureus* 6538 P становить 20 мкг/мл; щодо *Escherichia coli* ATCC 25922 – 6,7 мкг/мл, а до *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – 10 мкг/мл відповідно. Протестовані розчини володіють високою антимікробною активністю, що за деякими показниками перевищує активність відомих антисептиків (хлоргексидину біглоконат, триклозан) [5].

## Висновки

1. Здійснили скринінг наявності антимікробної дії розчинів цитратів срібла та міді, що одержані українськими вченими за оригінальною технологією.

2. Досліджувані розчини цитратів срібла та міді у різних концентраціях проявляють виражену антимікробну дію як до грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів. Встановили залежність антимікробної дії від часу експозиції.

3. Дослідження дають змогу обґрунтувати дози активного фармацевтичного інгредієнта у складі вітчизняних антимікробних препаратів м'якої та рідкої форми випуску.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у розробці складів комбінованих лікарських препаратів антимікробної дії у вигляді гелю, мазі, крему та спрею для лікування дерматологічних, хірургічних захворювань різної етіології.

## Список літератури

1. Бабушкіна І.В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / Бабушкіна І.В., Бородулін В.Б., Коршунов Г.В. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – С. 11–14.
2. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації МОЗ України / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Ширококов та ін.; ДФЦ МОЗ України. – К., 2004. – 38 с.
3. Luna V.A. Susceptibility of 169 USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to two copper-based biocides, CuAL42 and CuWB50 / Luna V.A., Hall T.J., King D.S. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – P. 939–941.
4. Metal-Based Antibacterial Substrates for Biomedical Applications / Paladini F., Pollini M., Sannino A., Ambrosio L. // *Biomacromolecules.* – 2015. – №16. – P. 1873–1885.
5. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate // Т. Koburger, N.-O. Hubner, M. Braun, J. Siebert, A. Kramer та ін. // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – P. 939–941.

## References

1. Babushkina I.V., Borodulin V.B., Korshunov G.V., et al. (2010) Izuchenie antibakterialnogo deystviya nanochastits

medi i zheleza na klinicheskie shtammy *Staphylococcus aureus* [The study of the antibacterial action of iron and copper nanoparticles on clinical strains of *Staphylococcus aureus*]. *Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurnal*, 1(6), 11–14. [in Russian].

2. Volianskyi, Yu. L., Hrytsenko, I. S., Shyrobokov, V. P., et al. (2004) Vyvchennia spetsyficnoi aktyvnosti protymikrobykh likarskykh zasobiv [Studying of the specific activity of antimicrobial drugs]. Kyiv. [in Ukrainian].
3. Luna, V., Hall, T., King, D., & Cannons, A. (2010). Susceptibility of 169 USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to two copper-based biocides, CuAL42 and CuWB50. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(5), 939-941. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq092>.
4. Paladini, F., Pollini, M., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2015). Metal-Based Antibacterial Substrates for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 16(7), 1873-1885. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00773>.
5. Koburger, T., Hubner, N., Braun, M., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1712-1719. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq212>.

## Відомості про автора:

Полова Ж. М., к. фарм. н., доцент каф. аптечної та промислової технології ліків, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, E-mail: zpolova@yandex.ua.

## Сведения об авторе:

Полова Ж. Н., к. фарм. н., доцент каф. аптечной и промышленной технологии лекарств, Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, E-mail: zpolova@yandex.ua.

## Information about author:

Polova Zh. N., MD, PhD, Associate Professor, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine, E-mail: zpolova@yandex.ua.

Надійшла в редакцію 16.11.2015 р.