

Наносеребро и микроорганизмы

Доктор технических наук
Рогаткин Д.А., Смирнова О.Д.

Многие микроорганизмы за короткий период времени приобретают устойчивость, или резистентность, к антибиотикам, и это серьезная проблема для антибактериальной терапии. Приобретенная резистентность считается сегодня биологической закономерностью, которая, хотя и в разной степени, проявляется у всех микроорганизмов. К химиопрепаратам адаптируются не только бактерии, но и грибы, и вирусы. Поэтому врачи все время ищут новые подходы к профилактике и лечению, в частности - к лечению гнойно-воспалительных заболеваний. Для борьбы с ними разрабатывают и новые классы антибиотиков, и физические методы воздействия: фотодинамическую терапию, НО-терапию, воздействие низкочастотным ультразвуком (15—100 кГц), потоком гелиевой и аргоновой плазмы. В качестве антибактериальных средств давно применяют некоторые препараты серебра, причем развития резистентности к таким препаратам не обнаружено.

Не от Адама, так от Геродота

Еще в Древнем мире были известны обеззараживающие свойства серебра. По свидетельству Геродота, 2,5 тысячи лет назад персидский царь Кир II Великий во время походов использовал для хранения запасов воды сосуды из серебра. Этой же водой воинам промывали раны, так они скорее заживали и не гноились. В Древнем Египте в лечебных целях серебро использовали напрямую: египетские воины накладывали его на раны в виде тонких пластин. На Руси существовало поверье, что серебряные ложки, монеты и крестики, чернея, забирают на себя из окружающего пространства все вредное. Это поверье живо по сей день и творчески развито — на соответствующих сайтах можно прочитать о том, что серебро сорбирует «негативную энер-

гию, шлаки и токсины». На самом деле почернение серебра — это результат его взаимодействия с соединениями серы, при этом образуется сульфид серебра Ag_2S .

В XVI—XVII веках начинается «научно обоснованное» применение серебра в медицине, в первую очередь раствора азотнокислого серебра — ляписа (AgNO_3). Это произошло после того, как врачи Ян-Баптист ван Гельмонт и Франциск де ла Бое Сильвий получили его взаимодействием серебра с азотной кислотой. Во второй половине XIX века немецкий гинеколог Карл Креде обнаружил, что однопроцентный раствор ляписа подавляет гнойные гонорейные воспаления глаз у новорожденных. Его сын Бенне в 1897 году на XII Международном съезде врачей в Москве сообщил о больших возможностях применения препаратов серебра в гнойной хирургии и о хороших результатах лечения септической инфекции внутривенным их введением. Он же вместе с химиками предложил рецепты и первых коммерческих лекарственных форм коллоидных препаратов, содержащих серебро, — эти препараты, известные под названиями «колларгол» и «протаргол», применяются и сегодня, больше века спустя. До 1928 года, то есть до открытия Александром Флемингом пенициллина, растворы солей серебра были, видимо, единственными «антибиотиками», применявшимися в медицинской практике.

Фармакологические свойства этих и других препаратов серебра, согласно данным научной литературы, определяются биологической активностью ионов серебра Ag^+ , образующихся при диссоциации его соединений в воде или другом полярном растворителе. Как они образуются?

«Любая палка имеет два конца»

Даже серебряная, и сейчас мы это увидим. Вот, например, протаргол, или протеинат серебра. Это коллоидный раствор оксида серебра, получаемый из нитрата серебра и защищенный щелочным (натриевым) альбуминатом на основе сывороточного альбумина и желатина. Препарат содержит около 8% серебра, а 90% протаргола составляет защитный коллоид. При раство-

рении в воде протаргол образует, катионы Ag^+ и щелочные отрицательно заряженные золи, довольно устойчивые, которые содержат небольшое количество частиц, имеющих микроскопические размеры, — это продукты частичной коагуляции коллоида. При коагуляции белковые соединения серебра частично диссоциируют. Как часто пишут (и переписывают из одного «первоисточника» в другой), «ионы серебра способны блокировать сульфгидрильные группы ферментных систем микроорганизмов», «взаимодействуют с молекулами ДНК», «при реакции с белками образуют альбуминаты» и так далее, что приводит к угнетению роста и размножения микроорганизмов. Академик АН УССР Л.А. Кульский показал, что в зависимости от исходной концентрации микробы «поглощают» из раствора от 50 до 90% серебра. Когда-то в СССР ионы серебра даже пытались применять для обеззараживания питьевой воды, однако «серебряная вода» оказалась весьма нестабильна по своим параметрам.

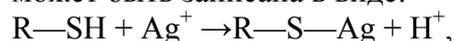
А еще хуже то, что при продолжительном (два - четыре года) контакте с серебром и его солями, даже если они поступают в организм человека малыми дозами, может развиваться необычное заболевание — аргирия. Посмотрите в Сети картинки: человек делается синим. А большие дозы при приеме внутрь могут вызвать тяжелые острые отравления, сопровождающиеся химическим ожогом слизистой оболочки полости рта, желудка, пищевода, приводят к судорогам, коллапсу, расстройству дыхания. Так что бесконтрольный прием ионов серебра весьма опасен.

В США, Австралии и некоторых других развитых странах сегодня никакие коллоидные препараты серебра официально не считаются лекарственными препаратами, но продаются свободно как биологически активные добавки к пище. Российские же санитарные нормы присваивают серебру класс опасности 2, то есть оно отнесено к высокоопасным веществам, подобно свинцу. Предельно допустимая концентрация (ПДК) серебра в питьевой воде определена в 50 мкг/л в России (СанПиН 2.1.4.1074-01 «Вода питьевая») и в 100 мкг/л согласно

нормам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). По последним данным ВОЗ, способность гарантированно убивать определенные бактерии наблюдается при концентрациях ионов серебра в растворе только свыше 150 мкг/л. Эта концентрация втрое больше безопасной для человека.

А теперь — химия и физика

Серебро — металл, в электрохимическом ряду напряжений оно стоит правее водорода и не замещает водород в большинстве реакций. Поэтому магическая фраза «серебро взаимодействует с сульфгидрильными группами белков-ферментов бактерий с образованием слабодиссоциирующих меркаптидов» (как то и должно быть для всех металлов левее водорода) требует пояснений. Теоретически такая реакция может быть записана в виде:



где R—SH — сульфгидрильная группа, а R—S—Ag — меркаптид, однако для ее протекания необходимы некоторые особые условия.

Сегодня приставка «нано» - популярный научный бренд, обозначающий все что угодно (вещества, технологии, объекты) в масштабах от единиц до сотен нанометров. Многие вирусологи, оптики, химики и молекулярные биологи до последнего времени даже и не подозревали, что занимаются нанотехнологиями. Развитие этих технологий и разработка наноматериалов вызвали дискуссии о возможной токсичности разного рода наночастиц. То и дело пишут о токсичности углеродных нанотрубок, наночастиц двуокиси титана, оксида цинка и ряда других наноматериалов. Некоторые публикации содержат сведения и о токсичности наночастиц серебра. Что-то из этого может иметь отношение к действительности, особенно если учесть, что частицы способны попадать в организм разными путями: с пищей, с вдыхаемым воздухом, с помощью инъекции в вену и т. п.

Особые свойства наночастиц принято связывать с их большой удельной поверхностью и соответственно с большой поверхностной энергией на единицу массы. Поэтому априори полагают, что актив-

ность металлов в наночастицах существенно возрастает, иногда не только количественно, но и качественно. Значит, по-новому может встать вопрос и об антибактериальной защите на основе наносеребра: в принципе не исключено, что меньшее количество серебра, не опасное для человека, будет лучше убивать микроорганизмы.

Крысы и чашки Петри

Получение наночастиц серебра — не слишком сложная задача, и для сотен литров раствора требуются считанные граммы серебра. Вот и появляются десятками и сотнями рекламные сообщения, предлагающие серебряную воду в качестве антимикробной панацеи.

К нам в лабораторию медико-физических исследований ГУ МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского, при которой имеется виварий с лабораторными животными, стали поступать предложения проверить на животных такую воду с наночастицами серебра на предмет ее обеззараживающих свойств. Причем для проверки предлагались самые невероятные методики. Например, моделировать на животных хирургические раны, одну группу поить и обрабатывать их раны поставленной фирмой специальной стерильной «серебряной водой», а другую группу животных поить и обрабатывать обычной «грязной» водой чуть ли не из уличных луж. И затем сравнить результаты заживления ран у этих двух групп животных... Очень длительный, дорогостоящий эксперимент, который мало что докажет: при обработке ран стерильной и «грязной» водой сравнение будет не в пользу последней вне зависимости от наличия серебра. Да и крысок жалко.

Между тем даже читатели научно-популярных журналов, а не только профессионалы-микробиологи знают стандартный и простой тест на чувствительность к антибиотикам. Культура микроорганизмов высевается в специальной чашке Петри на питательной подложке (например, кровяной агар), затем в нее капают антибиотический раствор или кладут таблетку антибиотика и смотрят дальнейшее развитие культуры.



1
Кровяной агар в чашке Петри, не засеянный микробной культурой

В качестве примера на фото 1 показана чашка Петри с кровяным агаром, не засеянным микробной культурой, а на фото 2 — та же чашка с микробной культурой (кишечная палочка *E.coli*) и таблетками антибиотиков (оксициллин, ампициллин, цефотаксим, имипенем). Вокруг эффективных таблеток четко видны прозрачные зоны гибели микроорганизмов — все просто и наглядно. Эксперимент легко воспроизводим в любой лаборатории мира, поэтому сомнительные таблетки и препараты можно независимо проверить хоть в России, хоть в Америке, хоть на Луне — где угодно. И не надо мучить животных (одноклеточных все же не так жалко).

Ровно это мы и решили сделать с растворами наносеребра в нашем институте. Мы уже предвкушали новую прорывную научную работу, уникальные графики зависимости процента погибших микроорганизмов от концентрации наночастиц серебра в растворе, обнаруженные новые различия в действии наночастиц серебра на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы и т. д. и т. п. Мы обратились к заведующей лабораторией микробиологии, кандидату медицинских наук Е.В. Русановой и кандидату биологических наук Е.Н.Петрицкой, которые стали идеологами и соисполнителями эксперимента, и вместе с другими научными сотрудниками МОНИКИ принялись за работу.



2

Чашка Петри с кишечной палочкой *E.coli* на кровяном агаре в эксперименте с антибиотиками

Детали: для специалистов

Мы взяли несколько штаммов бактерий. Грамотрицательные бактерии представляли контрольные штаммы кишечной палочки *Escherichia coli* (26941), а также *Klebsiella pneumoniae* (ATCC № 43062). Грамположительные - золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus* 209 P), как микроорганизм с факторами патогенности выше, чем у других стафилококков. Напомним, что грамположительные и грамотрицательные бактерии отличаются строением клеточной стенки; большинство опасных патогенов человека относятся к грамположительным. Грибы - клинические штаммы *Candida albicans*, возбудитель той самой молочницы, о которой нам так много интересного рассказывает реклама.

Основной объект исследования на животных — коллоидный раствор наночастиц серебра «Серебряный щит» производства московского ООО «Фрактал-М» с концентрацией наночастиц 50 мг/л и 100 мг/л и диаметром частиц порядка 15 ± 5 нм. Эта фирма не обращалась к нам по поводу тестирования, а просто любезно предоставила в наше распоряжение коллоидные растворы наночастиц серебра для экспериментов. Концентрация и размер наночастиц серебра в коллоидном растворе приводятся по данным предприятия-изготовителя; они соответствуют среднему расстоянию между частицами около 5 мкм. Концентрация в 100 мг/л — практически предельно дос-

тижимая, раствор с большей концентрацией получить можно, однако он будет уже седиментационно и агрегативно неустойчив, частицы будут слипаться и выпадать в осадок. Если при изготовлении раствора использовать поверхностно-активные вещества, достижимы и более высокие устойчивые концентрации, но эти вещества могут повлиять на результаты эксперимента. Поэтому мы хотели начать исследования именно с этих концентраций, надеясь на них получить максимальный антимикробный или как минимум бактериостатический эффект. А уже затем снижать концентрацию и наблюдать эффект, строить графики и зависимости.

В качестве объектов сравнения мы использовали 1 %-ный раствор протаргола, 0,02%-ный раствор фурацилина, пластинки из серебра и различные антибиотики (оксациллин, ампициллин, цефотаксим, имипенем).

Основное исследование с коллоидным раствором наночастиц серебра и объектами сравнения проводилось в двух сериях, по три опыта в каждой. При проведении первой серии опытов использовались суспензии 5ЕД по оптическому стандарту мутности. При этом количество микроорганизмов составляет около 5-10³ КОЕ (5106 на литр), что соответствует концентрации, способной вызывать воспалительную реакцию. Суспензии получали из суточной агаровой культуры, эмульгированной в физиологическом растворе, и равномерно засеивали по поверхности чашки Петри с кровяным агаром для культивирования бактерий и со средой Сабуро для *C.albicans*. Засеянные чашки маркировали, разделяя на сектора с номерами. Один сектор был контрольным, другие экспериментальными: в них мы прикапывали коллоидный раствор наночастиц серебра. После этого чашки помещали в термостат на 24 часа при 37°C.

Во второй серии опытов также использовали суспензии 5ЕД, полученные из суточной агаровой культуры, но их мы непосредственно эмульгировали в растворе наночастиц серебра с концентрациями 50 мг/л и 100 мг/л и затем высеивали на агар

— сразу после смешивания, через два часа и через 24 часа инкубации при 37°C.

И вот результаты

По окончании инкубации мы ожидали эффекта. Но получили уверенный равномерный рост культуры на всех засеянных секторах первой серии опыта и ровный газон во второй серии, без видимых отличий от сектора контроля (см., например, фото 3), и у бактерий, и у гриба. Таким образом, исследуемые коллоидные растворы наночастиц серебра с концентрациями в 50 и 100 мг/л (в тысячу раз превышающие ПДК для человека!) не оказали в нашем случае никакого бактерицидного влияния на рост микроорганизмов в границах поставленного опыта. На фото 3 можно видеть чашку Петри, поделенную на три сектора, где в первый и второй сектора был прикапан раствор наночастиц серебра с концентрациями в 50 и 100 мг/л соответственно, а третий сектор — контрольный. Микроорганизмы не прореагировали на нанофазное серебро — видимо, их никто не предупредил, что они должны были начать погибать.



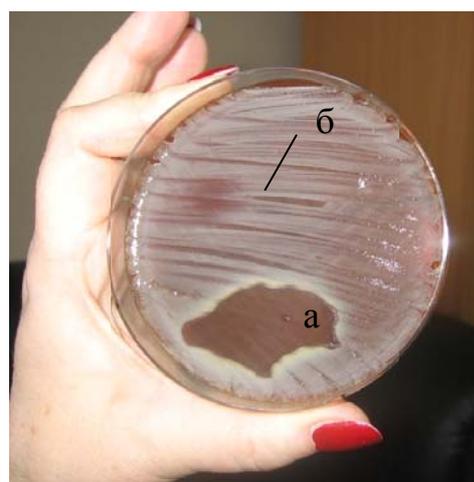
3

*Чашка Петри с культурой *K. pneumoniae* на кровяном агаре в эксперименте с коллоидным раствором наночастиц серебра. Сектор I — концентрация наночастиц 50 мг/л, сектор II — 100 мг/л, сектор III — контроль. Особой разницы не видно.*

«Ничего себе!» — подумали мы и для сравнения на тех же культурах попробовали увидеть антимикробное действие кусочков цельного серебра. Однако и здесь результата не получили.

Известна версия, что освященный серебряный крест обладает бактерицидным действием, и нам предлагали провести подобный эксперимент. Однако и с точки зрения науки, и с классической теологической точки зрения такой эксперимент по определению не может дать никакого иного результата, отличного от результата с простым кусочком серебра. В противном случае это было бы прямым научным доказательством существования Бога. Вопрос же существования Бога — это вопрос веры, а не научного опыта. Согласно и научным, и классическим религиозным представлениям, никакой естественнонаучный эксперимент не может дать ответ на вопрос о существовании Бога. Соответственно результат указанного эксперимента заведомо равен результату с обычными кусочками серебра, вне зависимости от веры экспериментатора. Поэтому мы его и не проводили.

Зато красивые и ожидаемые результаты были получены с протарголом, фурацилином и антибиотиками. На фото 2 и 4 это очень хорошо видно. Наконец-то! Не подвели нас стандартные препараты.



4

Подавление роста кишечной палочки растворами протаргола (а) и фурацилина (б).

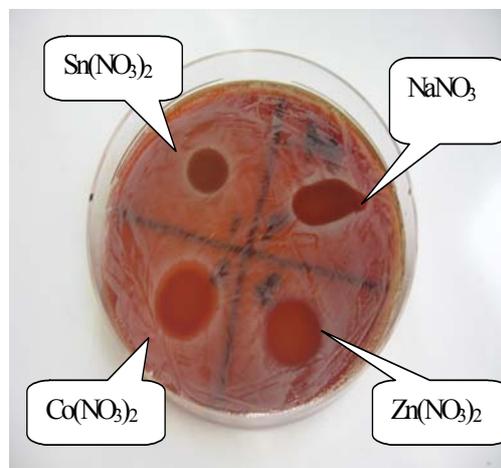
Появляется второй подозреваемый

Хотя в серьезной научной литературе есть убедительные доказательства антимикробного действия ионов серебра (например, N.Simonetti, «Electrochemical Ag⁺ for Preservative Use», "Applied and Environmental Microbiology", 1992, No. 12), начиная с концентрации ионов Ag⁺ в растворе в 150 мкг/л, с полными и убедительными экспериментальными данными, полученные нами результаты заставили нас немного в этом усомниться. Ведь протаргол, колларгол или ляпис (лекарственная форма — ляписный карандаш, содержит в равных весовых концентрациях смесь нитрата серебра и нитрата калия) помимо катионов серебра в растворе содержат еще и анионы каких-то молекул. Для ляписа, например, это анион NO³⁻, для протаргола — щелочной коллоид. Любые катионы в растворе уравниваются обычно какими-либо анионами, скажем ОН-группами воды. Если содержание этих групп выше 10⁻⁷ моль/л, раствор оказывается щелочью. Что, если отрицательно заряженные ионы в растворе препаратов также действуют губительно на микроорганизмы?

И мы поставили серию экспериментов с другими нитратами. А именно проверили, как действуют на рост грамположительных бактерий *S.aureus* и грамотрицательных *E.coli* водные растворы замещения AgNO₃ на нитраты других металлов — NaNO₃, Sn(NO₃)₂, Co(NO₃)₂ и Zn(NO₃)₂, в концентрациях, эквивалентных серебру 1 %-ного раствора AgNO₃, то есть 5,9·10⁻³ моль/л. Чашки Петри делили на четыре сектора, в центр каждого сектора поверх посеянной бактериальной культуры раскапывали один из четырех указанных растворов в количестве 30 мкл (фото 5). Эксперимент для надежности повторили трижды. После ночной культивации в течение 18 часов оказалось, что в местах прикапывания всех тестируемых растворов нитратов металлов рост обеих бактериальных культур полностью подавляется.

Таким образом, аналогичное 1%-ному раствору AgNO₃ бактерицидное действие оказывают и нитраты других металлов, что свидетельствует в пользу неспецифическо-

го (но, возможно, синергетического) действия нитрат-анионов в совокупности с катионами многих других металлов на бактериальные клетки. Казалось бы, удивительный и новый результат! Ан нет.



5

Пример с кровяным агаром и культурой *S.aureus* в дополнительном эксперименте с растворами замещения, не содержащими ионов серебра

Ничего принципиально нового...

...и удивительного в этих результатах нет. Если открыть любой хороший учебник по фармакологии (например, даже полувековой давности - Г.Н.Першин, Е.И.Гвоздева, Учебник фармакологии, Медгиз, 1961, он есть в Интернете), там обнаружится раздел «Соединения тяжелых металлов» в главе «Антисептические и дезинфицирующие средства», где говорится о бактерицидном действии многих тяжелых металлов. Для нас с вами ртуть и свинец тоже токсичны. А серебро - близкий к ним тяжелый металл. Действие многих других химреактивов на все живое тем, кто добросовестно изучал в школе химию, тоже известно. Чем же здесь удивляться, если, например, щелочной коллоид протаргола тоже обладает антимикробным действием? Нет сомнений, что фармакологический препарат протаргол в этом смысле был сделан грамотно, соотношение компонентов в нем было подобрано, видимо, на основе какого-то оптимума действия на микроорганизмы и ионов серебра, и других анионов с минимизацией вреда человеку.

Удивительно другое — то, что в XXI веке все еще сохраняется вера в бактерицидное действие цельного металлического серебра как некоего уникального металла. Про бактерицидное действие ртути, скажем, никто и не вспоминает. Хотя в медицине есть известные антибактериальные препараты и на основе ртути (ртуть двухлористая), и на основе висмута (ксероформ), и на основе свинца (свинцовая вода), и так далее. Действие всех этих препаратов комплексное, и часто в них действует не только металл в растворе.

Чернея от серы, серебро забавным образом породило средневековое заблуждение, а с развитием науки стало первым металлом, на основе которого было сделано первое «научно обоснованное» антибактериальное средство. И это еще больше, видимо, укоренило в умах людей это заблуждение. Неважно, что действие нитрата серебра — синергетическое, что анионы и катионы в растворе действуют совместно на микроорганизмы. Важно для поддержания заблуждения, что это все от действия серебра. И сегодня это заблуждение пытается втиснуться в современные реалии, «волшебное» серебро приобретает новомодную частичку «нано».

На самом же деле растворимость цельного металлического серебра в воде ничтожно мала — много меньше 10^{-13} г/л. А ионы серебра в воде могут появиться только при растворении цельного серебра или его солей. С солями вроде AgNO_3 все понятно. Они дают в 1 %-ном растворе кон-

центрацию на три порядка выше ПДК, а это уже сильная токсическая доза. В морской воде содержится около 10^{-7} г/л серебра, это на три порядка ниже ПДК, поэтому в морской воде хорошо себя чувствуют не только люди, но и многие микроорганизмы. Чтобы из коллоидного раствора наночастиц серебра даже с предельной и очень токсичной концентрацией 100 мг/л получить концентрацию ионов, подавляющую бактерии, нужно, чтобы в воде растворился примерно 1% этого наносеребра. Хотя для наночастиц за счет увеличения поверхностной энергии можно ожидать увеличения растворимости, все же прогнозировать, что растворится 1 % благородного металла, не приходится. А ведь это только граница бактерицидного эффекта, для эквимолярной концентрации с протарголом раствориться в воде должно было бы уже все наносеребро.

Поэтому, видимо, и дают отрицательный результат наши опыты. Но с точки зрения классической химии такой результат был предсказуем. Просто надо учить химию и не забывать, что ПДК серебра для человека в питьевой воде, по данным ВОЗ, — порядка 100 мкг/л, а по российским нормам — еще вдвое меньше. Предлагаемые же разными фирмами растворы ионов серебра и коллоидные растворы наносеребра часто содержат более высокие концентрации. Мы крысок пожалели. Вы хотите поэкспериментировать на себе?