

[3] Водный кодекс Республики Казахстан от 9 июля 2003 года № 481-III (с изменениями и дополнениями по состоянию на 26.11.2019 г.).

[4] Кодекс Республики Казахстан от 25 декабря 2017 г. № 120-VI «О налогах и других обязательных платежах в бюджет» (Налоговый кодекс) (с изменениями и дополнениями по состоянию на 02.07.2020 г.).

[5] СТ РК 1662-2007 Вода для заводнения нефтяных пластов. Требования к качеству.

[6] Единые правила по рациональному и комплексному использованию недр // утв. Приказом Министра энергетики РК от 15 июня 2018 г., № 239.

[7] Перечень загрязняющих веществ и видов отходов, для которых устанавливаются нормы эмиссий // утв. приказом Министра энергетики РК от 21.01.2015 г. № 26 (с изменениями от 11.09.2015 г.).

[8] Методика определения нормативов эмиссий в окружающую среду // утв. Приказом Министра охраны окружающей среды от 16.04.12 г. № 110-п (с изменениями по состоянию на 17.06.2016 г.).

[9] Бочевер Ф.М., Лапшин Н.Н., Орадовская А.Е. Защита подземных вод от загрязнения // М., Недра, 1979 – 254 с.

[10] Гольдберг В.М. Взаимосвязь загрязнения подземных вод и природной среды // Л., Гидрометеоиздат, 1987 – 247 с.

[11] Бондаренко С.С., Вартамян Г.С. Методы изучения и оценки ресурсов глубоких подземных вод // М., Недра, 1986 – 479 с.

[12] Веригин Н.Н., Васильев С.В., Куранов Н.П. Методы прогноза солевого режима грунтов и грунтовых вод // М., Колос, 1979 – 336 с.

[13] Мироненко В.А., Румынин В.Г. Опыт - миграционные работы в водоносных пластах. // М., Недра, 1986 – 238 с.

[14] Гидрогеологические исследования для обоснования подземного захоронения промышленных стоков. Под редакцией В.А. Грабовникова // М., Недра, 1993 – 335 с.

[15] Плотников Н.И. Техногенные изменения гидрогеологических условий // М., Недра, 1989 – 267 с.

[16] Отраслевой стандарт РК 1662-2007. (СТ Вода для заводнения нефтяных пластов. Требования к качеству).

[17] РД 51-31323949-48-2000 Методическое руководство. Гидрогеоэкологический контроль на полигонах закачки промышленных сточных вод // ООО «Газпром ВНИИГаз» при участии: ООО «ВолгоУралНИПИГаз», АО «СевКавНИПИГаз», ООО «ТюменНИИгипрогаз», М, 2000 - 181 с.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСА AG(I) С ЦИСТИНОМ

Сильников Владимир Николаевич

*доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
Института Химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
г. Новосибирск, Россия*

Zhang Zhenwei

*Linyi Institute of Industrial Technology
Linyi Applied Science and Technology Park,
Nanjing Road, Linyi City, Shandong Province, China*

Liu Chengjie

*Shandong Yang Du Jianhua Pharmaceutical Co., Ltd.
Intersection of Yuquan Road and Xiangyang Road,
Yinan County, Linyi City Shandong Province, China*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE AG (I) COMPLEX WITH CYSTINE

Silnikov Vladimir Nikolaevitch

*Doctor of Sciences
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS
Novosibirsk, Russia*

Zhang Zhenwei

*Linyi Institute of Industrial Technology
Linyi Applied Science and Technology Park,
Nanjing Road, Linyi City, Shandong Province, China*

Liu Chengjie

*Shandong Yang Du Jianhua Pharmaceutical Co., Ltd.
Intersection of Yuquan Road and Xiangyang Road,
Yinan County, Linyi City Shandong Province, China*

АННОТАЦИЯ

Данная статья посвящена первичной оценке антибактериальной активности комплекса серебра с цистином в отношении грамотрицательных и грамположительных патогенов, а также естественной микрофлоры человека. Показана высокая антибактериальная активность в отношении *Pseudomonas*

aeruginosa и *Staphylococcus aureus*, сопоставимая с активностью антибиотика ципрофлоксацина. Активность в отношении *Lactobacillus acidophilus* проявляется в значительно более высокой концентрации. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения данного соединения для лечения бактериальных инфекций.

ABSTRACT

This article is devoted to the primary study of the antibacterial activity of the silver-cystine complex against gram-negative and gram-positive pathogens, as well as the natural human microflora. High antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was shown, comparable to the activity of the antibiotic ciprofloxacin. Activity against *Lactobacillus acidophilus* is shown in a significantly higher concentration. The results obtained indicate the prospects of using this compound for the treatment of bacterial infections.

Ключевые слова: Комплекс серебра; цистин; антибактериальная активность; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Lactobacillus acidophilus*.

Keywords: Silver complex; cystine; antibacterial activity; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Lactobacillus acidophilus*

Введение

Средина двадцатого века ознаменовалась победой над широким кругом бактериальных инфекций. Во много это было обеспечено введением в клиническую практику в 40-50-е годы прошлого столетия значительного числа структурно новых антибиотиков. Последовавший за этим почти полувековой период, в течение которого наблюдалось лишь усовершенствование (модификация) предложенных ранее структур, однозначно можно характеризовать как инновационный кризис в данной области [1]. Широкое и подчас бесконтрольное применение антибиотиков привело к появлению устойчивости целого ряда патогенов человека практически к любому из применяемых препаратов [2]. В течение более 30 лет в основу этиотропной терапии тяжелых инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам многих групп, было положено применение карбапенемов — антибиотиков группы бета-лактамов, эффективных в отношении многих грамположительных и грамотрицательных аэробов и анаэробов. Однако в 2008 году был обнаружен новый штамм хорошо известного микроорганизма *klebsiella pneumoniae*, продуцирующего неизвестный ранее фермент, получивший название «Нью-Дели металло-бета-лактамаза» (NDM) и делающий данный штамм устойчивым к антибиотикам группы карбапенемов. Последующее стремительное распространение таких микроорганизмов по всему миру [3], а также установление того факта, что ген, ответственный за продуцирование NDM, почти всегда связан с генами, ответственными за устойчивость к антибиотикам других групп [4,5] заставило говорить о закате эры антибиотиков [6].

Отдельно следует отметить, что антибиотики не действуют на вирусы. Последний момент является достаточно важным, так как развитие вирусологии привело к осознанию первичности вирусной этиологии для многих заболеваний, клиническое проявление которых обусловлено сопутствующими бактериальными инфекциями. Принципиальное различие в мишенях для противовирусных и антибактериальных препаратов существенно затрудняет создание соединений, способных с близкой эффективностью

воздействовать на столь различные патогены. Перспективной основой для создания препаратов способных воздействовать как на вирусные, так и на бактериальные патогены являются соединения на основе серебра [7-10].

Ранее нами был предложен перспективный противовирусный препарат Аргосил — двойной комплекс Ag(I) с цистином $C_6H_{19}Ag_2N_4LiO_6S_2$, [11] исследована токсичность, противовирусная активность *in vitro* и *in vivo*, механизм действия и фармакокинетика [12-15].

В настоящей работе нами проведена первичная оценка антибактериальной активности препарата в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Материалы и методы

В работе использовался водный раствор препарата Аргосил с концентрацией действующего вещества 1 мг/мл.

В качестве препарата сравнения использовали антибиотик ципрофлоксацин (Ciprofloxacin, концентрация 2 мг/мл, водный раствор для инфузий).

Бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Lactobacillus acidophilus* (штамм «Нарине») были получены из коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). Ципрофлоксацин использовали в качестве положительного контроля антибактериальной активности. Стерильная вода использовалась в качестве отрицательного контроля

Для работы использовали суспензию ночных бульонных культур, выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) в суспензии определяли методом биологического микротитрования в 5 повторях.

Для оценки спектра антибактериального действия препаратов на патогены определяли минимальную подавляющую (бактериостатическую) концентрацию (МПК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) для препарата по отношению к используемым тест-штаммам: методом двукратных

серийных разведений в жидкой питательной среде (при 2 - х значениях посевной дозы).

В пробирки со средой Мюллер-Хинтона вносили микроорганизмы с минимальной (10^4 КОЕ/мл) или максимальной (10^7 КОЕ/мл) посевной концентрацией и исследуемый препарат в соответствующем разведении. Контроль – без внесения препарата. Пробирки инкубировали стационарно при температуре 37°C в течение суток. Результат учитывали визуально (по помутнению среды) и биологическим титрованием (для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в пробирках с внешне прозрачной средой). Затем из пробирок с прозрачной средой делали пересевы для выявления живых микробных клеток. Наименьшую концентрацию препарата, при которой в пробирке наблюдалась явная задержка роста, считали как МПК, наименьшую концентрацию в пробирке, после посева из которой не выявилось живых м/о, считали как МБК для данного препарата.

Для оценки влияния препарата на естественную микрофлору организма исследуемый препарат вводили в молочную среду одновременно

с посевной концентрацией *Lactobacillus acidophilus* ($\sim 10^6$ КОЕ/мл), инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Результаты определяли по наличию или отсутствию характерного сгустка в молоке. Контроль – молочная среда с *Lactobacillus acidophilus* без внесения образцов.

Бактерицидную активность (БА) оценивали условно:

+ наличие активности (резкое уменьшение количества м/о);

- отсутствие активности (увеличение или сохранение количества м/о, сравнимое с контролем).

Результаты и обсуждение

Исследование антимикробной активности синтетических препаратов по отношению к патогенным микроорганизмам *in vitro* проводили в соответствии с Методическими указаниями по изучению противомикробной активности фармакологических веществ [16].

Результаты представлены в виде таблиц 1 и 2, где указаны бактериостатические и бактерицидные концентрации для каждого препарата для 2-х посевных доз патогенов.

Таблица 1.

Значения МПК и МБК препаратов по отношению к *Staphylococcus aureus*

Концентрация	МПК (в мкг/мл)		МБК (в мкг/мл)	
	$A_{\min} (10^4)$	$A_{\max} (10^7)$	$A_{\min} (10^4)$	$A_{\max} (10^7)$
Доза патогена				
Аргосил	0,1	0,1	0,2	0,2
Ципрофлоксацин	0,2	0,8	0,8	3,1

Таблица 2.

Значения МПК и МБК препаратов по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*

Активность	МПК (в мкг/мл)		МБК (в мкг/мл)	
	$A_{\min} (10^4)$	$A_{\max} (10^7)$	$A_{\min} (10^4)$	$A_{\max} (10^7)$
Доза патогена				
Аргосил	1,6	6,2	6,2	12,5
Ципрофлоксацин	1,6	1,6	3,1	12,5

Новые препараты могут рассматриваться как перспективные для дальнейшего изучения, если значения их МПК *in vitro* не превышают 10-20 мкг/мл. [16]. Таким образом, Аргосил, на ряду с противовирусной активностью, обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. При этом антибактериальная активность сопоставима с активностью контрольного антибиотика ципрофлоксацина.

Как известно, одним из побочных эффектов применения антибиотиков является резкое снижение количества кишечной микрофлоры. Результаты воздействия препарата на одного из представителей кишечной микрофлоры - *Lactobacillus acidophilus* представлены в таблице 3. Как видно из представленных данных, при концентрации, при которой Аргосил проявляет антибактериальную активность в отношении естественной микрофлоры в 10-100 раз выше концентраций, при которых наблюдается активность в отношении патогенов.

Таблица 3.

Антибактериальная активность в отношении спор рода *Bacillus* и *Lactobacillus acidophilus*.

Образец	С (мкг/мл)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
		наличие сгустка	БА
Аргосил	100	нет	+
	10	да	-
	1	да	-
Контроль	0	да	-

Таким образом, Аргосил может оказаться перспективной основой для создания препаратов,

направленных на лечение вирусных заболеваний, осложненных бактериальными инфекциями.

Работа выполнена в рамках Проект базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № АААА-А17-117020210021-7

Литература

1. Walsh C. Where will new antibiotics come from? // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2003. - V.1. - P. 65-70.
2. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. // *Nature.* - 2000. - V. 406. - P. 775-781.
3. Berrazeg M, Diene S.M., Medjahed L., Parola P., Drissi M., Raoult D., Rolain J.M. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: An eReview using Google Maps. // *Euro Surveill.* – 2014. – V. 19/ - pii 20809.
4. Deshpande P., Rodrigues C., Shetty A., Kapadia F., Hedge A., Soman R. New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: Treatment options with Carbapenems Compromised. // *J Assoc Physicians India.* - 2010 – V. 58. - P. 147-9.
5. Moellering R.C. NDM-1 – A Cause for Worldwide Concern. // *N. Engl. J. Med.* – 2010 – V. 363. - P. 2377-9.
6. Majewski P., Sacha P., Wiczorek P., Ojdana D., Michalska A., Tryniszewska E. New Delhi Metallo-β-Lactamases – the dawn of a post-antibiotic era? // *Prog Health Sci.* – 2012. - V. 2. - P. 153-160.
7. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications and Therapeutic Approaches. // *Int J Mol Sci.* – 2016. – V. 17. – P. 1534.
8. Chen Y.N., Hsueh Y.H., Hsieh C.T., Tzou D.Y., Chang P.L. Antiviral Activity of Graphene-Silver Nanocomposites against Non-Enveloped and Enveloped Viruses. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2016. –V. 13. -P.430.
9. Tang S., Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. // *Adv. Healthc Mater.* – 2018. – V. 7. P. e1701503.
10. Sim W., Barnard R.T., Blaskovich M.A.T., Ziora Z.M. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007-2017) // *Antibiotics (Basel).* – 2018.- V. 7. – P.93.
11. Tretyakov V.V., Silnikov V.N., Vlasov V.V., Rikhter V.A., Tretyakova O.V. . Water-soluble antiviral agent based on silver-cistine compound and method of preparing thereof. // World intellectual property organization international Bureau. International Publication Number WO 2007/061337 A1; International Publication Date 31.05.2007.
12. Morozova O.V., Isaeva E.I., Silnikov V.N., Barinov N.A., Klinov D.V. Antiviral properties and toxicity of Ag-cystine complex. // *J. Virol. Emerg. Dis.* – 2016. V. 2. P. 1-8.
13. Gapeyev A., Plotnikov V. Investigation of DNA-damage and Chromosomal Aberrations in Blood Cells under the Influence of New Silver-based Antiviral Complex. // *Adv. Pharm. Bull.* – 2016. V. 6. - P. 71-4.
14. Silnikov V., Plotnikov E., Plotnikov V. Pharmacokinetic studies of new silver-based complex. // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2015. V. 6. – P. 41-3.
15. Silnikov V., Plotnikov E. In vitro effects of a novel silver-based complex on influenza virus // *J. Pharmacol. Pharmacother.* – 2018. – V. 9. – P. 186-90.
16. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под общ. ред. Р.У.Хабриева, Москва, 2005.