УКРАЇНА

(19) UA (11) 142954 (13) U

(51) МПК (2020.01)
C12Q 1/00
G01N 1/28 (2006.01)
C12R 1/45 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 11031**

(22) Дата подання заявки: **08.11.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.07.2020**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2020, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):
Лобань Галина Андріївна (UA),
Фаустова Марія Олексіївна (UA),
Чумак Юлія Вікторівна (UA),
Ананьєва Майя Миколаївна (UA),
Басараб Ярослав Олексійович (UA)

(73) Власник(и):
УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ,
вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ВІДНОСНО ДО STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

(57) Реферат:

Спосіб визначення антибактеріальної активності наночастинок срібла відносно до Stahpylococcus epidermidis включає розведення, засів та інкубацію Stahpylococcus. Дослідження проводять на музейному штамі мікроорганізму S. Epidermidis, а для антибактеріальної дії використовують рідкі дисперсні системи на основі конденсату наночастинок срібла розміром 10 нм, що осаджені на кристали натрію хлориду шляхом електронно-променевої технології у вакуумі, причому масова частка срібла (Ag) складає 23,4 %. Як стабілізатор наночастинок срібла у водному середовищі використовують субстанцію 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату (мексидол) та 6 % розчину полівінілпіролідону (ПВП) низькомолекулярного (Неогемодез).

UA 142954 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути призначена для визначення ступеня антибактеріальної активності наночастинок срібла до Stahpylococcus epidermidis та використана у фармацевтичній промисловості.

Епідермальний стафілокок (лат. STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS) - належить до умовно-патогенної мікрофлори і в переважній більшості випадків не активізується. Однак у людей з ослабленим імунітетом він все ж може викликати описані вище симптоми. Більш того, у пацієнтів з імунодефіцитом мікроб стає причиною розвитку великого запального процесу, який може привести до смерті. І все ж в більшості випадків епідермальний стафілокок у дорослих заважає при хірургічних втручаннях. Епідермальний стафілокок - часта причина нагноєнь катетерів. У цьому випадку лікування зводиться до заміни інфікованого катетера іншим. Після усунення причини в більшості випадків імунна система сама справляється з вогнищем зараження, і курс антибіотиків не потрібно, хворому просто обробляється рана. Ще один прояв стафілокока у дорослих - інфікування сечовипускального каналу, яке частіше діагностується у жінок. Хвороба переноситься досить важко - підвищується температура, помітно запалення, з'являються гнійні висипання. Лікування в обов'язковому порядку включає антибіотики.

Відомо, що різноманітні сполуки срібла мають антимікробні властивості і широко використовуються у медицині. Хімічно чисте срібло не має вираженої бактерицидної дії і може набувати її лише при поверхневому окисленні чи взаємодії з іншими сполуками. Тому останнім часом все частіше використовуються колоїдні системи металічного срібла, стабілізовані різними високомолекулярними продуктами. Потенційно перспективними для цього можуть бути похідні 3-гідроксипіридину з їх значним спектром фармакологічних ефектів. Використання стабілізованих наночастинок срібла (НЧ), завдяки їх малому розміру (менше 100 нм), дозволяє знизити концентрацію металу, не впливаючи на його бактерицидні властивості. Крім цього вони мають значну питому поверхню, що збільшує ділянку контакту наночастинок з бактеріями та підвищує їх антибактеріальний ефект.

В даний час доведено, що срібло має більш виражені антимікробні властивості, ніж пеніцилін, біоміцин та інші антибіотики. Крім цього згубно діє на антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів, поява яких обумовлена широким застосуванням відомих препаратів. При використанні з традиційними антибіотиками срібло чинить синергічний ефект, пролонгуючи дію деяких із них у десятки разів. Тому пошук нових препаратів на основі наночастинок срібла є досить перспективним серед сучасних фармакологічних досліджень.

Серед тих, що відомі, є спосіб визначення протиадгезивних властивостей харчової сталі за показником щільності мікробної біоплівки, що включає вирощування біоплівки на пластинках нержавіючої сталі розміром 3×3 см протягом 12 год. температурою 37 °С, фіксацію і фарбування біоплівки етиловим спиртом, спектрофотометрію змивного розчину. Спосіб оцінювання нержавіючої сталі за показником щільності мікробних біоплівок при спектрофотометрії проводять наступним чином:до 0,5 од. - сталь проявляє відмінні протиадгезивні властивості; від 0,51 до 1,00 од. - добрі протиадгезивні властивості; 1,01-1,30 од. задовільні протиадгезивні властивості; 1,31 од. - незадовільні протиадгезивні властивості. Пат. на корисну модель 124201, Україна, МПК G01N 19/04(2006.01), G01N 17/00, G01N 9/00. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИАДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ХАРЧОВОЇ СТАЛІ ЗА ПОКАЗНИКОМ ЩІЛЬНОСТІ МІКРОБНОЇ БІОПЛІВКИ ШТ. STAPHYLOCOCUS AUREUS ATCC 25923/ Кравченюк Христина Юріївна (UA); Кухтин Микола Дмитрович (UA); Лазарюк Валерій Володимирович (UA); Шинкарук Оксана Юріївна (UA); заявник та патентовласник: Кравченюк Христина Юріївна (UA); Кухтин Микола Дмитрович (UA); Лазарюк Валерій Володимирович (UA); Шинкарук Оксана Юріївна (UA). - № u201710506; Заявл. 30.10.2017; Опубл. 26.03.2018, бюл. № 6/2018.

Найбільш близьким аналогом до запропонованої корисної моделі є спосіб визначення антибактеріальної активності меду по відношенню до Staphylococcusaureus, при якому готують однакові за об'ємом розчини меду в м'ясо-пептонному бульйоні 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, засівають культурою тест-штаму Staphylococcus aureus, інкубують протягом 24-48 годин при 37 °С і далі здійснюють перепосів засіяних розчинів меду на тверде живильне середовище, інкубують перепосіви протягом 24-48 годин при 37 °С, і визначають антибактеріальну активність меду по відношенню до Staphylococcusaureus за критеріями: перепосіви, в яких не виявили ріст колоній, вважають пригніченими розчином меду із бактерицидними властивостями, перепосіви з виявленим ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із бактеріостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим інтенсивним ростом колоній мікроорганізмів вважають утвореними розчином меду без антибактеріальної дії. Додатково готують аналогічні за об'ємом розчини меду в м'ясо-пептонному бульйоні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 та контрольний зразок м'ясо-пептонного бульйону, які засівають культурою тест-штаму Staphylococcus aureus, причому як тверде живильне середовища використовують жовтково-

сольовий агар, а перепосів засіяних та інкубованих розчинів меду і контрольного зразка м'ясо-пептонного бульйону на жовтково-сольовий агар та їх наступну інкубацію проводять для кожного розчину меду і контрольного зразка м'ясо-пептонного бульйону, при цьому використовують мед, що зберігався в умовах, які виключають зміни хімічного складу меду та його фізичних і антибактеріальних властивостей, причому кінцеве визначення антибактеріальної активності меду по відношенню до Staphylococcus aureus здійснюють, виходячи з концентрацій меду, що виявляють бактеріостатичну дію за критеріями: перепосіви з виявленим слабким ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із помірними бактеріостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим помірним ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактеріостатичними властивостями. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що кожен розчин меду в м'ясо-пептонному бульйоні та контрольний зразок м'ясо-пептонного бульйону готують кількістю 2 мл, а їх засів проводять 1-ю краплею 18-годинної культури тест-штаму мікроорганізму Staphylococcus aureus з розведенням м'ясо-пептонним бульйоном до 10^5-10^6 м.т./мл. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як мед, антибактеріальну активність якого визначають, використовують мед, що не піддавався температурному впливу вище 37 °С, та дії хімічних сполук. Спосіб, за яким слабкий ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 1 до 10, помірний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 11 до 100, а інтенсивний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній більше 100. Пат. на корисну модель 129688 Україна, МПК G01N 33/02 (2006.01), G01N 33/554(2006.01), C12Q 1/04. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МЕДУ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО STAPHYLOCOCCUS AUREUS/ Лісогурська Ольга Вікторівна (UA); Лісогурська Діна Володимирівна (UA); Фурман Світлана Володимирівна (UA); Кривий Михайло Миколайович (UA); заявник та патентовласник: ЖИТОМИРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРОЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, бульвар Старий, 7, м. Житомир, 10008 (UA). - № u201804450; Заявл. 23.04.2018; Опубл. 12.11.2018, бюл. № 21/2018.

В основу корисної моделі поставлена задача вивчення чутливості еталонних штамів Stahpylococcus epidermidis до дисперсних систем наночастинок срібла.

Поставлену задачу вирішують створенням способу визначення антибактеріальної активності наночастинок срібла відносно до Stahpylococcus epidermidis, що включає розведення, засів та інкубацію Stahpylococcus, згідно з корисною моделлю дослідження проводять на музейному штамі мікроорганізму S. Epidermidis, а для антибактеріальної дії використовують рідкі дисперсні системи на основі конденсату наночастинок срібла розміром 10 нм, що осаджені на кристали натрію хлориду шляхом електронно-променевої технології у вакуумі, причому, масова частка срібла (Ag) складає 23,4 %, а як стабілізатор наночастинок срібла у водному середовищі використовують субстанцію 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату (мексидол) та 6 % розчину полівінілпіролідону (ПВП) низькомолекулярного (Неогемодез).

Дослідження проводили у об'ємі 1 мл розведення робочого розчину з остаточною концентрацією досліджуваного мікроорганізму 5×10^5 КУО/см^3. За допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником 0,5 мл робочого розчину вносили в першу пробірку з 0,5 мл поживного бульйону. Після ретельного змішування 0,5 мл розчину, що утворився, переносили в наступну пробірку, в якій містилося 0,5 мл поживного бульйону. Дану процедуру повторювали доки не був приготований необхідний ряд розведень, але не менше 10 пробірок. Із останньої пробірки 0,5 мл розчину видалялося. Як інокулюм готували мікробну суспензію досліджуваної культури, використовуючи стандарт МакФарланда. В кожну пробірку з готовим подвійним розведенням робочого розчину і в одну пробірку з 0,5 мл поживного бульйону ("негативний" контроль) вносили по 0,5 мл щойно приготованого інокулюма. Всі пробірки, окрім "негативного" контролю, інкубувалися у звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом однієї доби. Пробірка з "негативним" контролем зберігалася при температурі 4 °С до обліку результатів.

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) визначали за найменшою концентрацією робочого розчину, що була здатна пригнічувати видимий ріст досліджуваної культури мікроорганізму, наявність якого оцінювали шляхом огляду пробірки у прохідному світлі, порівнюючи з "негативним" контролем. Як препарат порівняння використовували 0,05 % розчин хлоргексидину біглюконату.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel. Аналіз достовірності - за критерієм Ст'юдента.

За результатами досліджень музейні штами мікроорганізмів виявилися чутливими до досліджуваних розчинів. Дисперсна система H_4Ag з дистильованою водою (H_2O) викликала незначну затримку росту мікроорганізмів. Комбінація наночастинок срібла з мексидолом та ПВП виявила значну протимікробну активність відносно досліджуваних музейних штамів

мікроорганізмів, порівняно з розчином, що містив Ag+H_2O. Бактеріостатична дія 0,05 % розчину хлоргексидину біглюконату, бактеріостатична не перевищувала досліджувані зразки розчинів на основі наночастинок срібла.

МІК розчинів наночастинок срібла (n=5)

	Ag+мексидол+ ПВП, мкг/мл M±m	Ag+H_2O, мкг/мл M±m	Хлоргексидину біглюконат, мкг/мл M±m
S. epidermidis	4,65±0,60*	21,99±0,44	3,91±0,22

Примітка: * - достовірність різниці показників МІК розчину Ag+мексидол+ПВП до показників МІК розчину Ag+H_2O, $p<0,05$

Отримані дані розширяють уявлення про чутливість S. epidermidis до дисперсних систем наночастинок срібла. Використання отриманих результатів в медицині підвищить антибактеріальну дію традиційних антибіотиків так як срібло чинить синергічний ефект, пролонгуючи дію деяких із них у десятки разів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення антибактеріальної активності наночастинок срібла відносно до Stahpylococcus epidermidis, що включає розведення, засів та інкубацію Stahpylococcus, який **відрізняється** тим, що дослідження проводять на музейному штамі мікроорганізму S. Epidermidis, а для антибактеріальної дії використовують рідкі дисперсні системи на основі конденсату наночастинок срібла розміром 10 нм, що осаджені на кристали натрію хлориду шляхом електронно-променевої технології у вакуумі, причому масова частка срібла (Ag) складає 23,4 %, а як стабілізатор наночастинок срібла у водному середовищі використовують субстанцію 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинату (мексидол) та 6 % розчину полівінілпіролідону (ПВП) низькомолекулярного (Неогемодез).

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП “Український інститут інтелектуальної власності”, вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601