

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭЛЕКТРОЛИЗНОГО СЕРЕБРА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОЛИКА

¹Кафедра мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф и

²кафедра нормальной анатомии

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина 4. E-mail: irina.shimaeva@mail.ru

В работе оценена активность микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов (НГ) при стимулировании их разными дозами электролизного раствора серебра (ЭРС) для увеличения поглотительной способности и переваривания микробных тел при фагоцитозе.

В исследовании были использованы 44 особи здоровых кроликов-самцов одного веса. Им после получения контрольных показателей фагоцитоза внутривенно вводили исследуемые дозы ЭРС на сахарозе. Через 30, 60 и 120 мин при следующих заборах крови определяли те же показатели фагоцитарной активности нейтрофилов.

На фоне внутривенного введения ЭРС увеличилось количество активных нейтрофилов, выросли число поглощенных бактерий и процент их переваривания. Наиболее эффективной стала доза 0,025 мг серебра на 1 кг веса животного.

Электролизные растворы серебра в малых дозах оказывают стимулирующее действие на микробицидную систему нейтрофильных гранулоцитов, что выражается в усилении их фагоцитарной активности.

Ключевые слова: электролизное серебро, нейтрофилы, фагоцитоз.

**I. V. CHIMAEVA¹, S. B. AVAKIMJAN², I. S. SEVER², A. N. KOSTYLEV¹,
A. B. VANJANTS², S. V. CHIGRIN²**

INFLUENCE OF ELECTROLITIC SOLUTION OF SILVER ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF RABBIT NEUTROPHILS

¹Department mobilization training of health and disaster medicine,

²department of general anatomy and Kuban state medical university,
Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4. E-mail: irina.shimaeva@mail.ru

To evaluate the activity of microbicidal system of neutrophilic granulocytes while stimulated by different doses of electrolytic solution of silver (ESS) to increase the absorbing and digesting potential of microbic bodies in phagocytosis.

In the research there were used 44 male rabbits of equal weight. After obtaining check index of phagocytosis the investigated doses of ESS were given intravenously with saccharose. In 30, 60 and 120 minutes blood samples were taken to investigate the core parameters of phagocytic activity of neutrophiles (activity of microbicidal system of neutrophilic granulocytes, absorbing and digesting potential of microbic bodies).

As a consequence of intravenous input of ESS the number of active neutrophiles increased, as well as the amount of bacterias absorbed and digested. The most effective dose was 0,025 mg of silver per kg.

Small amounts of ESS efficiently stimulate the microbicidal system of neutrophilic granulocytes, which is shown by the increase of phagocytic activity.

Key words: electrolytic solution of silver (ESS), neutrophils, phagocytosis.

Введение

Поиск новых антибактериальных средств на протяжении последних двух десятилетий остается весьма актуальной задачей, что обусловлено быстрым развитием резистентности микрофлоры к вновь синтезированным препаратам. В этой связи в последние годы увеличилось число исследований, направленных на изучение се-

ребросодержащих соединений, которые имеют антибактериальную [9], противовирусную [4], противоопухолевую активность [8], а также ряд других преимуществ.

Внимание к этим препаратам стало еще более заметным с появлением нанопрепаратов серебра и полученными результатами от их применения при лечении различных воспалительных

процессов, вирусных и грибковых поражений [7, 10]. Рядом исследователей продемонстрированы высокая антимикробная активность ионов серебра [6], а также противомикробная активность ионов серебра, применяемого в сочетании с антибиотиками [5]. С этой точки зрения определенный интерес представляют электролизные растворы серебра (ЭРС), которые можно вводить внутривенно в отличие от соединений серебра, использующихся внутрь или наружно. Ранее в экспериментах *in vitro* нами было показано, что электролизное серебро обладает высокой бактерицидной активностью и потенцирует антибактериальное действие антибиотиков [2], к тому же обладает противоопухолевым действием [1]. В настоящей работе в экспериментах на кроликах изучали влияние внутривенно вводимых ЭРС на функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов.

Материалы и методы исследования

Все эксперименты выполнены на беспородных кроликах-самцах весом 2,8–3,0 кг. В работе использовали электролизные растворы серебра, производимые ООО «Кубаньагроток». Эти растворы вследствие низкой осмолярности при внутривенном введении вызывают гемолиз. Поэтому для обеспечения изотоничности в растворы ЭРС добавляли раствор сахарозы, который в изоосмолярной концентрации (10%-ный раствор – 5 мл), как было установлено в контрольной серии опытов (9 животных), не вызывает гемолиза и не изменяет функциональной активности нейтрофилов.

Наряду с этим до выполнения основной серии опытов нами исследованы токсичность и пирогенность ЭРС. Токсичность ЭРС оказалась незначительной, что подтверждено в исследованиях на 10 мышах. Так, внутрибрюшинное введение ЭРС в дозе, превышающей оптимальную действующую дозу в 150 раз, не приводило к гибели животных ни в ранние, ни в отдаленные сроки (2 месяца) после введения. В опытах на 5 кроликах-альбиносах установлена апиогенность растворов ЭРС.

Основная серия экспериментов выполнена на 44 кроликах.

Контрольная группа (I группа) представлена интактными животными, которым вводили только 10%-ный раствор сахарозы в количестве 5 мл. Для изучения фагоцитарной активности нейтрофилов кроликам внутривенно вводили ЭРС в смеси с 10%-ным раствором сахарозы (5 мл). При этом ЭРС в дозе 0,025 мг/кг веса вводили 9 животным (II группа), в дозе 0,05 мг/кг веса – 13 животным (III группа) и в дозе 0,1 мг/кг веса – 13 животным (IV группа).

Предварительно у каждого животного во всех группах производили забор крови для исследования контрольных показателей, после чего сразу же вводили ЭРС в исследуемых дозах. Затем, через

30, 60, 120 мин после внутривенного введения ЭРС, у каждого животного из исследуемых групп произведен забор крови из краевой вены уха. В полученных образцах с использованием микробной взвеси лабораторного штамма *St. aureus* № 209 на физиологическом растворе в концентрации 1×10^6 на 100 нейтрофильных лейкоцитах исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов, фагоцитарное число и процент переваривания бактерий. Процент фагоцитоза определяли путем подсчета из 100 нейтрофильных лейкоцитов клеток, способных к активному захвату микробных частиц. Фагоцитарное число рассчитывали определением среднего количества бактерий, захваченных одним активным нейтрофилом. Процент переваривания определяли как отношение количества убитых к общему числу фагоцитированных бактерий.

Метаболическую активность нейтрофилов и определение их функционального резерва оценивали по их способности восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ-тест) [3], для чего вычисляли средний цитохимический индекс (СЦИ), который после определения достоверности различий представляли в у. е.

Результаты исследований статистически рассчитывали разностным методом с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверность результатов ($p < 0,05$) обозначали *.

Результаты исследования и их обсуждение

В приведенных таблицах представлены результаты исследований по выявлению влияния различных доз ЭРС на показатели фагоцитоза нейтрофилов кролика. В экспериментах, выполненных на 9 кроликах (I группа), выявлено, что через 30, 60 и 120 мин после внутривенного введения 10%-ного раствора сахарозы (5,0 мл) не отмечалось изменений функциональной активности нейтрофилов. В частности, не наблюдалось достоверных изменений количества активных нейтрофилов, фагоцитарного числа и процента переваривания бактерий (табл. 1, 2, 3).

Анализ полученных данных показал, что уже через 30 мин после внутривенного введения кроликам все исследованные нами дозы ЭРС вызывали повышение фагоцитарной активности нейтрофилов по сравнению с контролем (табл. 1, 2, 3). Указанная тенденция сохранялась к 60 и 120 минутам после введения ЭРС. При этом показатели фагоцитоза зависели от дозы вводимого электролизного раствора серебра. Так, наибольший эффект отмечен после внутривенного введения ЭРС через 30, 60 и 120 мин в дозах 0,025 и 0,05 мг/кг веса. Наименьшее влияние на фагоцитоз нейтрофилов оказывала доза ЭРС 0,1 мг/кг. Различия между исходными и опытными результатами в группах, а также по отношению к контрольной группе на этапах исследований рассчитаны с использованием

Влияние различных доз ЭРС на процент фагоцитоза нейтрофилов кролика (%)

Группы	Исходные данные	Время после в/в введения ЭРС		
		30 минут	60 минут	120 минут
I (контрольная)	59,12 ± 2,85	62,01 ± 2,91	59,71 ± 2,41	59,42 ± 1,72
II	59,11 ± 2,29	88,69 ± 2,07***	90,92 ± 2,03***	89,00 ± 1,41***
III	63,53 ± 3,22	88,54 ± 2,41***	87,30 ± 2,80***	86,81 ± 1,79***
IV	61,84 ± 2,73	83,00 ± 2,77***	84,92 ± 2,64***	82,53 ± 2,01***

Примечание: * p<0,05 – по отношению к исходному в группе, ** p<0,05 – по отношению к контрольной группе на этапах исследований.

Таблица 2

Влияние различных доз ЭРС на фагоцитарное число нейтрофилов кролика (у. е.)

Группы	Исходные данные	Время после в/в введения ЭРС		
		30 минут	60 минут	120 минут
I (контрольная)	4,22 ± 0,21	4,31 ± 0,36	4,28 ± 0,28	4,20 ± 0,30
II	4,20 ± 0,28	6,22 ± 0,38***	6,41 ± 0,48***	6,35 ± 0,36***
III	4,64 ± 0,38	5,91 ± 0,45***	6,11 ± 0,49***	6,05 ± 0,51***
IV	4,38 ± 0,25	5,10 ± 0,36	5,27 ± 0,46	5,20 ± 0,49

Примечание: * p<0,05 – по отношению к исходному в группе, ** p<0,05 – по отношению к контрольной группе на этапах исследований.

Таблица 3

Влияние различных доз ЭРС на переваривание бактерий нейтрофилами кролика (%)

Группы	Исходные данные	Время после в/в введения ЭРС		
		30 минут	60 минут	120 минут
I (контрольная)	32,27 ± 1,11	34,12 ± 1,41	32,62 ± 1,18	32,55 ± 1,21
II	32,24 ± 1,33	52,02 ± 1,71***	52,40 ± 1,56***	51,84 ± 1,72***
III	33,01 ± 1,78	46,22 ± 1,68***	48,04 ± 1,84***	49,10 ± 1,72***
IV	32,64 ± 1,09	41,52 ± 1,52***	42,73 ± 1,42***	40,92 ± 1,56***

Примечание: * p<0,05 – по отношению к исходному в группе; ** p<0,05 – по отношению к контрольной группе на этапах исследований.

Таблица 4

Влияние различных доз ЭРС на изменение спонтанного и стимулированного НСТ-теста (СЦИ в у. е.)

Группы	Доза	НСТ-тест	Исходные данные	Время после в/в введения ЭРС		
				30 минут	60 минут	120 минут
II	0,025 мг/кг	Спонтанный	100	155 *	174 *	161 *
		Стимулированный	100	184 *	238 *	187 *
III	0,05 мг/кг	Спонтанный	100	140 *	122 *	127 *
		Стимулированный	100	162 *	178 *	178 *
IV	0,1 мг/кг	Спонтанный	100	123 *	117 *	111 *
		Стимулированный	100	173 *	186 *	172 *

Примечание: * p<0,05 – по отношению к исходному в группе.

t-критерия Стьюдента (статистически достоверны при $p < 0,05$).

Усиление переваривающей способности нейтрофилов под влиянием электролизного раствора серебра (табл. 3) обусловлено повышением активности бактерицидных систем нейтрофилов. Киллинг микроорганизмов, поглощенных нейтрофилами, осуществляется с помощью кислородзависимых и кислороднезависимых механизмов. В первом случае происходит окисление кислорода НАДФ Н-оксидазной системой (респираторный взрыв), в результате чего образуются активные формы кислорода, перекись водорода, оказывающие сильное микробицидное действие.

Внутривенное введение ЭРС сопровождалось повышением метаболической активности стимулированных бактериями нейтрофилов, что проявлялось в увеличении цитохимического индекса в НСТ-тесте по сравнению с контролем.

Наибольшее увеличение процента положительно реагирующих с НСТ нейтрофилов по сравнению с контролем было отмечено при использовании ЭРС в дозе 0,025 мг/кг. Так, через 60 мин после внутривенного введения ЭРС цитохимический индекс повысился в 1,7 раза по сравнению с исходными данными в группе. Минимальный эффект наблюдали при использовании дозы ЭРС 0,1 мг/кг.

Таким образом, внутривенное введение ЭРС в концентрациях 0,025, 0,05 и 0,1 мг/кг веса животных усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов кролика. При этом возрастает количество фагоцитирующих нейтрофилов, а также увеличивается их поглотительная и переваривающая способность. Наиболее эффективными дозами были 0,025 и 0,05 мг/кг веса животных.

Одним из факторов, способствующих увеличению функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов при внутривенном введении электролизного раствора серебра, является повышение активности кислородзависимых микробицидных систем в фагоцитирующих нейтрофилах кролика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакимян С. Б., Бахмутский Н. Г., Щимаева И. В. Способ лечения злокачественных опухолей. Патент № 2271209, 2006 г.
2. Авакимян С. Б., Север И. С., Крылов В. П., Егорова С. В. Влияние электролизного серебра на устойчивость бактерий к антибиотикам // Кубанский научный медицинский вестник. – 2005. – № 7–8 (80–81). – С. 12–13.
3. Нестерова И. В., Слынько Л. И., Светличная М. А., Майченко Л. Г. Диагностика изменений в микробицидной системе нейтрофильных гранулоцитов при аллергических заболеваниях: Методические рекомендации. – Краснодар, 1989. – 20 с.
4. Третьяков В. В., Третьякова О. В., Жевачевский Н. Г. Способ лечения ВИЧ-инфекций. 2001 г. Патент 2195277.
5. Ahmad R. Shahverdi, Ali Fakhimi, Hamid R. Shahverdi, Sara Minaian. Sintesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli // Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine. – 2007. – Vol. 3. Issue 2. June. – P. 168–171.
6. Der-Chi Tien, Kuo-Hsiung Tseng, Chin Yu Liao, Tsing-Tshin Tsung. Identificatin and quantification of ionic silver from colloidal silver prepared by electric spark discharge system and its antimicrobial potency study // Journal of alloys and compounds. – 2009. – Vol. 473. Issues 1–2. 3 April. – P. 298–303.
7. Dong-xi Xiang, Qian Chen, Lin Pang, Cong-long Zheng. Inhibitory effect of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro // Journal of virological methods. – 2011. – Vol. 178. Issues 1–2. Desember. – P. 137–142.
8. Durairandy N (1), Lakra R., KunnavakkamVinjimur S., Samanta D., K. P. S., Kiran M. S. Caging of plumbagin on silver nanoparticles imparts selectivity and sensitivity to plumbagin for targeted cancer cell apoptosis // Metallomics. – 2014. – Oct 22. № 6 (11). – P. 2025–2033. doi: 10. 1039/c4mt00165f.
9. Khan S. S., Mukherju F., Chandrasekaran N. Stadies on interaction of colloidal silver nanoparticlis (SNPS) five different bacterial species // Colloids surf B biointerfaus. – 2011. – № 87 (1). – P. 129–138.
10. Seung-Heon Shin, Mi-Kyung Ye. The effect of nano-silver on the activation of nasal polyp epithelial cells by Alternaria, Der P1 and staphylococcal enterotoxin B // International immunopharmacology. – 2011. – Vol. 11. Issue 11. November. – P. 1691–1696.

Поступила 23.11.2015