

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПО БИОЛОГИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ НАНОЧАСТИЦ Ag,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЭКСТРАКТА КОРИЦЫ ZEYLANICUM (CINNAMON
ZEYLANICUM)**

Ким Ын Зу

заведующая отделом наноматериалов, Госпиталь Красного Креста, КНДР, г. Пхеньян

Ри Юн Сик

канд. техн. наук, доцент, научный сотрудник отдела наноматериалов, Политехнический университет имени Ким Чака, КНДР, г. Пхеньян

Ким Сен Чхор

канд. техн. наук, научный сотрудник отдела наноматериалов, Политехнический университет имени Ким Чака, КНДР, г. Пхеньян; аспирант ДВФУ, РФ, г. Владивосток

**A study on the biological effect of Ag nanoparticles, obtained using with the extract of the
cinnamon zeylanicum**

Kim Un Ju

Head of nanomaterial office, Red Cross General Hospital, DPR of Korea, Pyongyang

Lee Yun Sik

candidate of technical science, associate professor, Researcher of nanomaterial office, Kim Chaek University of technology, DPR of Korea, Pyongyang

Kim Song Chol

candidate of technical science, Researcher of nanomaterial office, Kim Chaek University of technology, DPR of Korea, Pyongyang;

Post graduate student, FEFU, Russia, Vladivostok

Аннотация. В статье представлены результаты измерения наночастиц серебра, полученных методом "зеленого" синтеза с использованием экстракта корицы zeylanicum (Cinnamon zeylanicum), являющимся лекарственным растением, с помощью

лазерного гранулометра, рассмотрены их бактерицидные и бактериостатические свойства, токсичность, а также биологическое действие на параметры крови. Было обнаружено, что наночастицы Ag, полученные методом "зеленого" синтеза с использованием экстракта корицы *zeylanicum*, обладают лучшими бактерицидными и бактериостатическими свойствами, чем наночастицы Ag, полученные другими методами, и оказывают положительное действие на биологические показатели в крови.

Abstract. The size of silver nanoparticles obtained by the green synthesis method using cinnamon *zeylanicum*, which is a medicinal plant for human health, was measured using a laser granulometer and their bactericidal and bacteriostatic properties, toxicity, and also the effect on biological action in blood. It was found that Ag nanoparticles obtained by the green synthesis method using *zeylanicum* cinnamon extract have better bactericidal and bacteriostatic properties than Ag nanoparticles obtained by other methods and have a positive effect on the biological indices in the blood.

Ключевые слова: наночастицы Ag; экстракт корицы; бактерицидное свойство; бактериостатическое свойство; токсичность; зеленый синтез; лекарственное растение; биологический показатель; ферменты в крови.

Keywords: Ag nanoparticles; cinnamon extract; bactericidal property; bacteriostatic property; toxicity; green synthesis; medicinal plant; biological indicator; enzyme in blood.

Введение. В последние годы предпринимаются огромные усилия по использованию экологически чистых методов синтеза наночастиц благородных металлов, а они, в большинстве своем, проводятся при использовании растительных или фруктовых экстрактов. Эти методы "зеленого" синтеза являются дешевыми по себестоимости, быстрыми, эффективными, и обычно позволяют получать кристаллические наночастицы разных размеров в зависимости от свойств и концентрации используемых растительных экстрактов, также уровня pH, температуры и времени инкубации реакции синтеза [1-11].

В настоящее время активно ведутся исследования по изучению потенциального биологического действия наночастиц Ag, синтезированных химическим и биологическим методами. Они могут довольно активно взаимодействовать с биомолекулами на поверхности и внутри клеток человека. Этот факт позволяет предположить, что наночастицы Ag можно с большим успехом использовать для достижения прогресса в диагностике и лечении многих опасных для жизни заболеваний. В частности, наночастицы Ag более полезны в терапии рака за счет снижения ими содержания АТФ, разрушения митохондрий, увеличения формирования вида активных форм кислорода и разрушения других метаболитов в пораженных клетках [12-14].

В статье исследованы антимикробная активность, влияние на биохимические показатели крови и токсичность наночастиц Ag, полученных биологическим методом, который является

более стабильным, надежным и дешевым по себестоимости, чем другие распространенные методы.

Экспериментальная часть. Наночастицы Ag были получены путем незначительного изменения метода, предложенного M. Sathishkumar и соавт. [11]. Стандартный производственный процесс заключается в следующем: измельчение сухой коры корицы *zeulanicum*, закупленной на рынке; перемешивание 4 г полученного порошка с 250 мл дистиллированной воды с последующим экстрагированием биоматериала при 80 °C в течение 2 ч (раствор А). Далее – добавление 3 мл раствора А на 1 л Ag^+ ионизированной воде, имеющей концентрацию 70 ppm, полученной способом электролиза. При температуре реакции в 25 °C, цвет раствора постепенно переходит в желтый, а через 3 дня – в светло-желтый в результате завершения реакции восстановления (раствор Б). Это связано с присущим наночастицам Ag плазмонным резонансным поглощением. Если температура реакции повышается до 60 °C, время реакции сокращается до 2 ч. В работе установлена концентрация раствора наночастиц Ag 70 ppm.

Измерен размер полученных наночастиц Ag с помощью лазерного гранулометра марки ВТ-90.

Антимикробная активность исследована следующим образом: производилось смешивание 0,02 мл раствора золотистых стафилококков и кишечных палочек (соответственно 100 миллионов – 1 миллиард) с 1 мл раствором Б и оставление на 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, а затем производилось высевание этих растворов на агаризованную питательную среду и оценка количества сформированных колоний. Оценена мощность бактериостаза дисковым методом после вымачивания фильтровальной бумаги в растворе Б в течение 30 мин и 1 ч.

Исследовано влияние на биохимические показатели крови следующим образом: пациентам перорально вводился водный раствор (раствор Б), содержащий наночастицы Ag, по 10 мл до еды в течение месяца; до и после введения изучаемого препарата проведены гематологические и биохимические исследования крови.

Проведено исследование токсичности полученных наночастиц Ag путем введения изучаемого препарата в хвостовую вену лабораторных белых мышей и дальнейшего изучения влияния наночастиц Ag на биохимические тесты.

Результаты и обсуждение. На рисунке 1 показан результат измерения размера наночастиц Ag, полученных с использованием экстракта корицы *zeulanicum* (*Cinnamon zeulanicum*). Как видно на рисунке, средний диаметр наночастиц Ag составляет 19,8 нм, а диапазон распределения частиц по размерам – 16,2-25 нм, из этого следует, что дисперсность частиц хорошая.

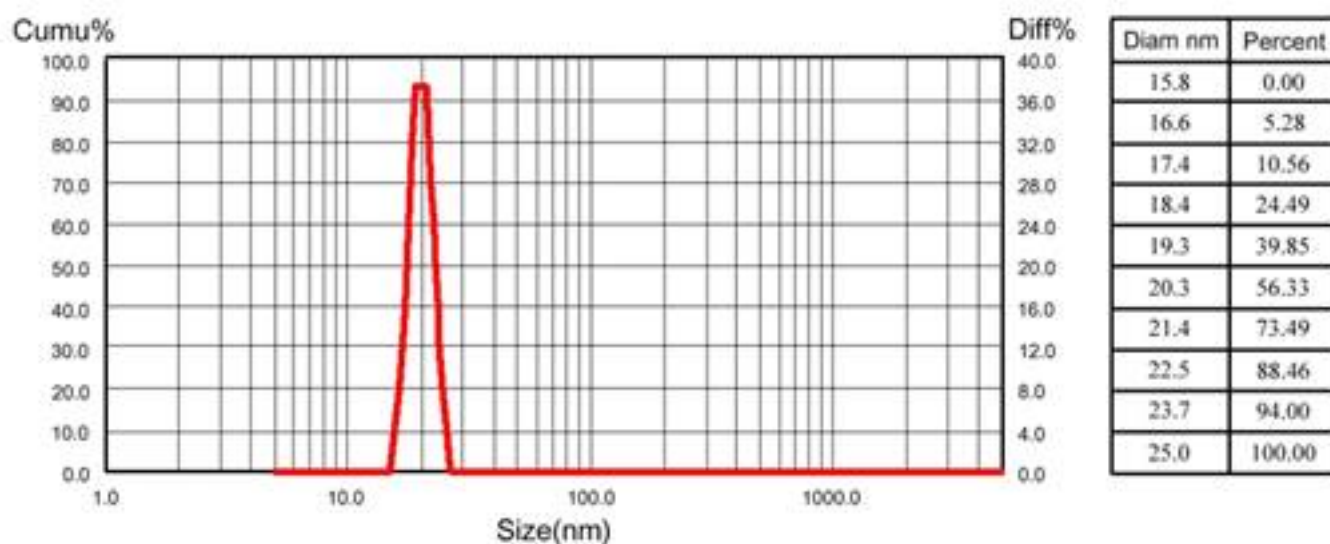


Рисунок 1. Результат измерения размера наночастиц Ag

В таблице 1 приведены бактерицидные свойства наночастиц Ag, полученных биологическим методом, по сравнению с наночастицами Ag, полученными химическим и электролитическим методами, и Ag⁺-ионизированной водой. Действие наночастиц проверялось с использованием микроорганизмов – золотистый стафилококк и кишечная палочка (E. coli).

Как видно по таблице, наночастицы Ag, полученные биологическим методом, обладают лучшими бактерицидными свойствами, чем те, которые получены другими способами.

В таблице 2 приведены результаты исследования бактерицидных характеристик наночастиц Ag, на основании подсчета сформированных колоний, в соответствии с методом. В качестве объекта выбраны золотистый стафилококк и кишечная палочка, а количество бактерий составляло 10⁸ клеток/мл.

Таблица 1.

Бактерицидные характеристики наночастиц Ag в зависимости от способа изготовления и времени воздействия (золотистый стафилококк/кишечная палочка, 10⁸ бактерий/мл)

Метод получения частиц Ag	Время действия			
	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч
Биологический	+/+	+/+	+/+	+/+
Химический	+/+	+/+	+/+	+/+
Электролитический	+/-	+/+	+/+	+/+
Ион серебра	-/-	-/-	+/+	+/+

Примечание: здесь и далее – +: антибактериальная активность, -: отсутствие антибактериальной активности.

Таблица 2.

Характеристики образования колоний наночастиц Ag в зависимости от способа изготовления и времени воздействия (золотистый стафилококк/кишечная палочка, 10⁸ бактерий/мл)

Метод получения частиц Ag	Время действия			
	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч
Биологический	0/0	0/0	0/0	0/0
Химический	0/0	0/0	0/0	0/0
Электролитический	0/10	0/0	0/0	0/0
Ион серебра	более 10 / более 10	более 10 / 10	6/4	12/0

Как показано в таблицах 1 и 2, наночастицы Ag, полученные биологическим методом, химическим методом и электролитическим методом, показали бактерицидное действие в течение 5 мин., а ион Ag^+ показал бактерицидное действие в течение 30 мин.

На основании данных, представленных в таблице 3, при концентрации бактерий равной 10^9 клеток/мл, полная бактерицидная активность не наблюдалась даже по истечении 1 ч, и лишь через 20 часов установлена полная бактерицидная активность у всех препаратов.

Бактериостатические характеристики наночастиц Ag в зависимости от способа изготовления показаны в таблице 4.

Таблица 3.

Бактерицидные характеристики наночастиц Ag в зависимости от способа изготовления и времени действия (золотистый стафилококк/кишечная палочка, 10^9 бактерий/мл)

Метод получения частиц Ag	Время действия			
	10 мин	30 мин	1 ч	20 ч
Биологический	-/-	-/-	-/-	+/+
Химический	-/-	-/-	-/-	+/+
Электролитический	-/-	-/-	-/-	+/+
Ион серебра	-/-	-/-	-/-	+/+

Таблица 4.

Бактериостатические характеристики наночастиц Ag в зависимости от способа изготовления и времени действия (золотистый стафилококк/кишечная палочка, 10^9 бактерий/мл)

Метод получения частиц Ag	Время действия		
	5 мин	30 мин	1 ч
Биологический	0/8	8/8	10/8
Химический	0/8	10/8	9/8
Ион серебра	0/0	0/0	8/8

Как показано в таблице 4, в растворе наночастиц Ag проявилась бактериостатическая способность в течение 30 минут и более, а в растворе ионов Ag появилась лишь в течение 1 часа и более.

Результаты исследования воздействия наночастиц Ag на биохимические показатели крови представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Влияние наночастиц Ag на свойства коагуляции крови

№	Ф.И.О. пациента	Ht, %			Fib		
		До лечения	После лечения	Разница	До лечения	После лечения	Разница

1	Ма Ен Су	47	45	-2	324	233	-91
2	Ли Сун Чел	44	41	-3	244	258	+14
3	Ким Ен Су	47	48	+1			
4	Кан Чан Хек	49	45	-4	527	360	-167
5	Ким Ген Ил	49	47	-2	347	276	-71
6	Ким Сук	42	40	-2	340	378	+38
X±SD		46,3±2,8	44,3±3,2		356,4±103,9	301±64,2	
P		0,03			0,2		

Примечание: здесь и далее Ht – гематокрит; Fib – концентрация фибриногена.

Как показано в таблице 5, наночастицы Ag значительно снизили показатели Ht (гематокрит).

В таблице 6 показан результат изучения изменения активности фермента при использовании наночастиц Ag.

Таблица 6.

Характеристики активности ферментов при использовании наночастиц Ag

№	Ф.И.О. пациента	GPT, Ед/л			GOT, Ед/л			γ-GT, Ед/л		
		До леч.	После леч.	Разн.	До леч.	После леч.	Разн.	До леч.	После леч.	Разн.
1	Ма Ен Су	33	17	16	30	14	16	112	67	45
2	Ли Сун Чел	66	30	36	84	47	37	2451	1188	1263
3	Мун Хе Ен	111	48	63	22	33	11	36	22	14
4	Кан Чан Хек	39	19	20	27	19	8	296	188	108

Примечание: здесь и далее GPT – аланинаминотрансфераза; GOT – аспаратаминотрансфераза; γ-GT – Гамма (γ) – глутамилтрансфераза.

Как показано в таблице 6, активность ферментов при использовании наночастиц Ag была снижена в четырех случаях.

Результаты исследования влияния наночастиц Ag на липидный обмен в крови приведены в таблице 7.

Таблица 7.

Влияние наночастиц Ag на общий уровень холестерина и триглицерида в крови

№	Ф.И.О. пациента	ТС, мг/%			TG, мг/%		
		До лечения	После лечения	Разн.	До лечения	После лечения	Разн.
1	Ма Ен Су	208	172	36	301	269	32
2	Ли Сун Чел	266	258	8	179	327	148
3	Ким Ен Су	204	189	15	146	108	38
4	Ким Ен Хо	159	200	41	91	343	252
5	Ли Мен Чел	230	212	18	258	161	97
6	Ким Сук	230	70	60	184	156	28
7	Ким Ген Ир	168	131	37	116	99	17
X±SD		209,3±37,27	190,3±39,6		182,1±72,1	209±102,2	

Р	0,164	0,58
---	-------	------

Примечание: здесь и далее ТС – общий холестерин; TG – триглицериды.

В таблице 8 представлены результаты исследования токсичности наночастиц Ag.

Как показано в таблице 8, белые мыши на 100% выживали при введении наночастиц Ag в хвостовую вену.

Изменения биохимических контрольных показателей крови, при пероральном введении наночастиц Ag на протяжении 30 дней показаны в таблице 9.

Таблица 8.

Результаты исследования токсичности наночастиц Ag (n=5)

Время наблюдения	Живые мыши	Погибшие мыши	Выживаемости, %
После инъекции	5	0	100
15 мин.	5	0	100
24 ч.	5	0	100
48 ч.	5	0	100
72 ч.	5	0	100

Таблица 9.

Исследование токсичности наночастиц Ag с использованием биохимических тестов крови

Показатели	n	До введения	После введения	Р
GPT, Ед/л	12	31,3±8,7	18,4±3,18	0,04
GOT, Ед/л	11	23,2±6,5	18,9±3,5	0,32
γ-GT, Ед/л	9	327,8±267,0	172,2±128,0	0,29
Cre	8	1,6±0,8	0,8±0,4	0,37
ZTT	10	6,9±0,5	7,0±0,37	0,87
TTT	10	1,6±0,2	1,7±0,2	0,47
ML	10	-	-	-

Как показано в таблице 9, при пероральном введении наночастиц Ag, показатель GPT был значительно снижен, при этом существенных изменений в таких показателях как: GOT, γ-GT, Cre, ZTT, TTT и ML не отмечено.

Выводы. В статье исследованы биологические свойства наночастиц Ag, полученных биологическим методом с использованием экстракта корыцы *zeulanicum*. Бактерицидная активность биологически полученных наночастиц Ag была выше, чем у полученных другими методами наночастиц Ag и ионов Ag⁺. Биологически полученные наночастицы Ag снижали гематокрит и активность ферментов в крови организма и не проявляли токсичности.

Список литературы:

1. Kalimuthu Kalishwaralal, Venkataraman Deepak, SureshBabu Ram Kumar Pandian, Muniasamy Kottaisamy, Selvaraj BarathManiKanth, Bose Kartikeyan, Sangiliyandi Gurunathan «Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2010), 257-262
2. Virender K. Sharma, Ria A. Yngard, Yekaterina Lin «Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities» *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(2009), 83-96
3. Amanulla Mohammed Fayaz, PhD, Kulandaivelu Balaji, PhD, Morukattu Girilal, PhD, Ruchi Yadav, MTech, Pudupalayam Thangavelu Kalaichelvan, PhD, Ramasamy Venketesan, PhD «Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2010), 103-109
4. Aruna Jyothi Kora, R.B. Sashidhar, J. Arunachalam «Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application» *Carbohydrate Polymers*, 82(2010), 670-679
5. Audra I. Lukman, Bin Gong, Christopher E. Marjo, Ute Roessner, Andrew T. Harris «Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates» *Journal of Colloid and Interface Science*, 353(2011), 433-444
6. J.G. Bocarando-Chacon, M. Cortez-Valadez, D. Vargas-Vazquez, F. Rodríguez Melgarejo, M. Flores-Acosta, P.G. Mani-Gonzalez, E. Leon-Sarabia, A. Navarro-Badilla, R. Ramírez-Bon «Raman bands in Ag nanoparticles obtained in extract of *Opuntia ficus-indica* plant» *Physica, E* 59(2014), 15-18
7. Liesje Sintubin, Willy Verstraete, Nico Boon «Biologically Produced Nanosilver: Current State and Future Perspectives» *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, Vol. 109, No. 10, October
8. Yu.A. Mirgorod, V.G. Borodina «Preparation and Bactericidal Properties of Silver Nanoparticles in Aqueous Tea Leaf Extract» *Neorganicheskie Materialy*, 2013, Vol. 49, No. 10, pp. 1056-1059
9. Suriya J, Bharathi Raja S, Sekar, V., Rajasekaran. R «Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. » *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(58), pp. 12192-12198, 19 July, 2012
10. Salprima Yudha S, Doni Notriawan, Eka Angasa, Totok Eka Suharto, John Hendri, Yuta Nishina «Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous rinds extract of *Brucea javanica* (L.) Merr at ambient temperature» *Materials Letters*, 97(2013), 181-183
11. M. Sathishkumar, K. Sneha, S.W. Won, C.-W. Cho, S. Kim, Y.-S. Yun «Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2009), 332-338
12. D. Prabhu, C. Arulvasu, G. Babu, R. Manikandan, P. Srinivasan «Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15» *Process Biochemistry*, 48(2013), 317-324
13. Pala Rajasekharreddy, Pathipati Usha Rani «Biofabrication of Ag nanoparticles using *Sterculia foetida* L. seed extract and their toxic potential against mosquito vectors and HeLa cancer cells» *Materials Science and Engineering C*, 39(2014), 203-212
14. Babu Gajendran, Arulvasu Chinnasamy, Prabhu Durai, Jegadeesh Raman, Manikandan Ramarc «Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Datura innoxia* and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7» *Materials Letters*, 122(2014), 98-102