

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ЖЕЛЕЗА НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

И.В. Бабушкина – ФГУ «СарНИИТО Росмедтехнологий», старший научный сотрудник отдела лабораторной и функциональной диагностики, кандидат медицинских наук; **В.Б. Бородулин** – ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, заведующий кафедрой биологической химии, профессор, доктор медицинских наук; **Г.В. Коршунов** – ФГУ «СарНИИТО Росмедтехнологий», главный научный сотрудник отдела лабораторной и функциональной диагностики, профессор, доктор медицинских наук; **Д.М. Пучиньян** – ФГУ «СарНИИТО Росмедтехнологий», заместитель директора по научной работе, профессор, доктор медицинских наук.

COMPARATIVE STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTION OF IRON AND COPPER NANOPARTICLES ON CLINICAL STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

I.V. Babushkina – Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Department of Laboratory and Functional Diagnostics, Chief Research Assistant, Candidate of Medical Science; **V.B. Borodulin** – Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Head of Department of Biochemistry, Professor, Doctor of Medical Science; **G.V. Korshunov** – Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Department of Laboratory and Functional Diagnostics, Senior Research Assistant, Professor, Doctor of Medical Science; **D.M. Puchinjan** – Saratov Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Deputy Director of Science, Professor, Doctor of Medical Science.

Дата поступления — 11.05.09 г.

Дата принятия в печать — 15.02.10 г. 15.02.10 г.

И.В. Бабушкина, В.Б. Бородулин, Г.В. Коршунов, Д.М. Пучиньян. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Саратовский научно-медицинский журнал, 2010, том 6, № 1, с. 11–14.

Цель: сравнительное изучение антибактериального действия наночастиц железа и меди на полиантибиотикорезистентные клинические штаммы *Staphylococcus aureus*.

Методы: изучали действие наночастиц меди и железа на 10 штаммах *Staphylococcus aureus*, выделенных от больных с гнойными осложнениями травматолого-ортопедического стационара. Серию разведений нанопорошков железа и меди готовили перед экспериментом в концентрациях от 0,001 до 1 мг/мл.

Результаты: установлено, что характер влияния наночастиц на рост клинических штаммов и выраженность антибактериального эффекта зависят от вида наночастиц, их концентрации, времени воздействия. Наночастицы железа, при использовании концентраций 0,1 мг/мл и 1 мг/мл, вызывают снижение количества микробных клеток от 3 до 34% ($p < 0,01$). В меньших концентрациях достоверного антибактериального эффекта не отмечается. Антибактериальная активность наночастиц меди выражена в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мг/мл, даже при кратковременном воздействии (30 мин) наблюдается уменьшение количества микробных клеток, выросших на твердой питательной среде, на 97–100% по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Заключение: наночастицы меди оказывают более выраженное ингибирующее воздействие на рост клинических штаммов золотистого стафилококка, чем суспензия наночастиц железа. Степень ингибирования зависит также от дозы ультрадисперсных порошков и времени инкубации.

Ключевые слова: наночастицы, железо, медь, *Staphylococcus aureus*.

I.V. Babushkina, V.B. Borodulin, G.V. Korshunov, D.M. Puchinjan. Comparative study of antibacterial action of iron and copper nanoparticles on clinical *Staphylococcus aureus* strains. Saratov Journal of Medical Scientific Research, 2010, vol. 6, № 1, p. 11–14.

Research objective is to study antibacterial action of nanoparticles of iron and copper on polyantibiotically resistant clinical *Staphylococcus aureus* strains.

Materials and methods include antibacterial action of nanoparticles of copper and iron on 10 *Staphylococcus aureus* strains, isolated from patients with purulent complications stayed in the in-patient department of traumatology and orthopedics. Solutions of powders of iron and copper have been prepared directly before the experiment in concentration from 0,001 to 1 mg/ml.

It has been revealed that the influence of nanoparticles on growth of clinical strains and the intensity of antibacterial effect depends on the form of nanoparticles, their concentration and action time. Concentration of 0,1 mg/ml and 1 mg/ml of iron nanoparticles has provoked the decrease in quantity of microbe cells from 3 to 34 % ($p < 0,01$). In smaller concentrations the reliable antibacterial effect has not been observed. Antibacterial activity of copper nanoparticles has been expressed in a wide range of concentrations from 0,001 mg/ml to 1 mg/ml, even during short-term action (30 minutes) it has provoked reduction of quantity of the microbe cells grown on the firm nutrient medium, 97–100 % in comparison with the control ($p < 0,001$).

In conclusion it is to point out that copper nanoparticles have more expressed inhibitory effect on growth of clinical strains of golden staphylococcus than iron nanoparticle suspension. Inhibition degree depends on superdispersed powder dosage and incubation period.

Keywords: nanoparticles, iron, copper, *Staphylococcus aureus*.

Введение. В течение последних 15 лет *Staphylococcus aureus* является одним из ведущих

возбудителей послеоперационных и посттравматических гнойных раневых осложнений в травматологии и ортопедии, таких как остеомиелит, абсцесс, флегмона. В связи с частым возникновением множественной антибиотикоустойчивости штаммов *Staphylococcus aureus* необходим поиск новых высокоэффективных антибактериальных препаратов [1]. Наночастицы

Ответственный автор - Бабушкина Ирина Владимировна, 410002 г. Саратов, ул. Чернышевского, 148
ФГУ «Саратовский НИИ травматологии и ортопедии Минздравсоцразвития»,
отдел лабораторной и функциональной диагностики
Тел.: 89272233881. E-mail: samiiito-lab@yandex.ru

меди проявляют ярко выраженную биологическую активность, в том числе бактериостатическое и бактерицидное действия. Имеются отдельные примеры изучения бактерицидного эффекта наночастиц железа и меди на штаммы *E.coli*, *St.aureus* [2]. Препараты меди, введенные в организм животных в виде наночастиц, обладают пролонгированным действием и меньшей токсичностью по сравнению с солями. Наночастицы меди при введении в организм стимулируют механизмы регуляции микроэлементного состава и активность антиоксидантных ферментов [3, 4, 5]. Наночастицы железа как в виде водной суспензии при подкожном введении, так и в виде мази при нанесении на раны обладают ярко выраженным ранозаживляющим эффектом [6]. На основе нанопорошков железа и меди были получены и апробированы препараты для ускоренного ранозаживления и лечения ожогов. Наночастицы металлов являются перспективным претендентом на создание нового класса антибактериальных препаратов [7].

Одной из главных причин изменения физических и химических свойств малых частиц по мере уменьшения их размеров является рост относительной доли «поверхностных» атомов. С энергетической точки зрения уменьшение размеров частицы приводит к возрастанию роли поверхностной энергии. Уменьшение частиц до нанометровых размеров приводит к проявлению в них так называемых «квантовых размерных эффектов». В настоящее время уникальные физические свойства наночастиц, возникающие за счёт поверхностных или квантово-размерных эффектов, являются объектом интенсивных исследований [8, 9].

Целью работы явилось сравнительное изучение антибактериального действия наночастиц железа и меди на клинические штаммы золотистого стафилококка.

Методы. Исследования проводились на 10 штаммах *Staphylococcus aureus*, выделенных от больных с гнойными осложнениями, находящимися на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре Саратовского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (СарНИИТО) и обладающих резистентностью к пяти- и более профильным антибиотикам. В пробирки с разведениями нанопорошка добавляли по 100 мкл конечной суспензии (300000 КОЕ/мл) микроорганизмов, встряхивали и инкубировали в течение 30, 60, 120, 180 мин при комнатной температуре. В качестве контроля использовали такие же количества бактериальной взвеси, разведённые в аналогичных пропорциях с физиологическим

раствором и также выдержанные в течение тех же промежутков времени. После этого бактериальные взвеси, с каждой концентрации нанопорошков в количестве 100 мкл, высевали на чашки Петри с твёрдой питательной средой (мясо-пептонный агар), которые затем помещали в термостат на 24 часа при 37°C. Подсчёт колоний производили на следующий день.

Нанопорошки любезно предоставлены Саратовским плазмохимическим комплексом ФГУП РФ ГНЦ ГНИИ химической технологии элементоорганического синтеза (г. Москва).

Нанопорошок металлов получают из крупнодисперсного порошка меди марки ПМС1 ГОСТ 4960 – 75 и порошка железа марки Р-10 ГОСТ 13610 – 79 с помощью плазменной технологии, основанной на испарении сырья (крупнодисперсного порошка или прутка) до ультрадисперсных частиц требуемого размера в плазменном потоке с температурой 5000-6000°K и конденсации пара, дисперсность частиц меди 30-40 нм, частиц железа – 30-70 нм. Готовили взвесь нанопорошков в 0,9%-ном растворе NaCl в концентрациях, равных 0,001; 0,01; 0,1; 1 мг/мл.

Производили статистическую обработку материала с подсчетом средних значений (M), их среднеквадратичных ошибок (m) и уровня достоверности (p).

Результаты. Установлено, что характер влияния наночастиц на рост клинических штаммов и выраженность антибактериального эффекта зависят от вида наночастиц, их концентрации, времени воздействия на бактериальную взвесь.

Результаты подсчёта количества колоний *Staphylococcus aureus*, выросших на твёрдых питательных средах, после воздействия различных концентраций наночастиц железа в течение 30-180 мин, а также результаты подсчёта в контрольной группе, не подвергавшейся влиянию ультрадисперсных порошков, представлены в таблице 1.

После воздействия наночастиц железа в низких концентрациях – 0,001 мг/мл и 0,01 мг/мл при времени воздействия до 60 минут не отмечается достоверного изменения количества колоний на твердых питательных средах. При увеличении времени инкубации до 120-180 минут наблюдалось статистически достоверное увеличение количества колоний на твердых питательных средах от 6 до 45% ($p < 0,05-0,01$). Использование более высоких концентраций – 0,1 и 1 мг/мл вызывало статистически достоверное снижение количества бактериальных клеток – от 3 до 34% по мере увеличения экспозиции ($p < 0,05-0,01$).

Зависимость характера влияния нанопорошка железа в различных концентрациях на рост клиниче-

Таблица 1

Антибактериальное действие различных концентраций наночастиц железа на клинические штаммы золотистого стафилококка

Время воздействия, мин.	Контрольная группа (n=10)	Количество колоний на твердых питательных средах ($M \pm m$)			
		Опытные группы			
		1	2	3	4
		0,001 мг/мл, n=10	0,01 мг/мл, n=10	0,1 мг/мл, n=10	1 мг/мл, n=10
30	1234,2±46,7	1348,5±86,7	1064,6±112,0	1107,5±23,7 *	1098,7±22,5**
60	1380,7±31,3	1251,0±95,4	1245,4±78,3	1186,8±44,7 ***	1159,2±60,1***
120	954,1±23,5	1064,9±47,0*	1218,7±31,9 ***	849,1±18,8***	629,6±18,5***
180	1056,0±68,0	1314,2±71,7**	1449,8±67,5 ***	824,3±41,7**	728,6±38,1***

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

ских штаммов *Staphylococcus aureus* представлена на рисунке.

Таким образом, наночастицы железа в низких концентрациях (0,001 и 0,01 мг/мл) оказывают ростстимулирующее, а в более высоких концентрациях (0,1 и 1 мг/мл) обладают антимикробным действием в отношении клинических штаммов золотистого стафилококка.

Антибактериальная активность наночастиц меди колеблется в широком диапазоне концентраций от 0,001 мг/мл до 1 мг/мл. Результаты подсчёта количества колоний *Staphylococcus aureus*, выросших на твёрдых питательных средах, после воздействия различных концентраций наночастиц меди в течение 30-180 мин, а также результаты подсчёта в контрольной группе, не подвергавшейся влиянию ультрадисперсных порошков, представлены в таблице 2.

Концентрация 1 мг/мл даже при кратковременном воздействии (30 мин) вызывает полное уничтожение микробных клеток. 30-минутное действие меньшей концентрации (0,1 мг/мл) также вызывает значительное уменьшение числа колоний, выросших на мясопептонном агаре, – на 98% ($p < 0,001$). Концентрации 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл способствуют снижению количества колоний на твердой питательной среде на 97 и 96% соответственно при экспозиции, равной 30 мин ($p < 0,001$). Дальнейшее увеличение времени инкубации приводит к отсутствию роста на твердых питательных средах при использовании всех концентраций нанопорошков меди.

Таким образом, установлена высокая антибактериальная активность наночастиц меди в отношении полиантибиотикорезистентных клинических штаммов золотистого стафилококка, являющегося одним из наиболее частых возбудителей гнойно-воспалительных осложнений в травматологии и ортопедии.

Обсуждение. Наночастицы меди обладают многосторонним действием на бактериальную клетку. В частности установлено, что после обработки клеток медью происходит утечка из них катионов K^+ . Эти данные свидетельствуют о том, что барьерные свойства мембраны нарушаются при взаимодействии с ионами меди, концентрация которых определяется совокупностью окислительно-восстановительных процессов в примембранном пространстве [9].

Наночастицы меди в отличие от антибиотиков не вызывают селекции резистентных штаммов, что позволяет в дальнейшем рекомендовать для использования при лечении гнойных заболеваний, вызванных полиантибиотикорезистентными штаммами золотистого стафилококка.

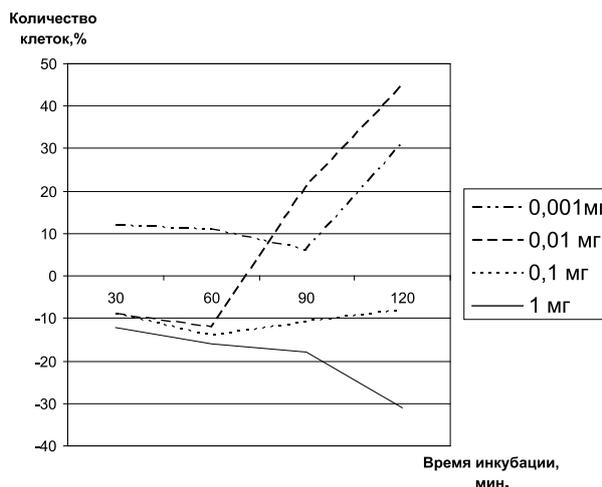


Рис. Влияние наночастиц железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*

Наночастицы железа обладают меньшей устойчивостью к окислению, образованием оксидной пленки на поверхности наночастиц, возможно, объясняется их меньший антибактериальный эффект при всех изученных концентрациях, а эффект стимуляции роста клеток стафилококка, вероятно, связан с тем, что его штаммы обладают способностью усваивать ионы железа из внешней среды [8].

Заключение. Таким образом, наночастицы меди обладают выраженным антибактериальным действием при использовании низких концентраций, значительно превышающим антимикробный эффект наночастиц железа, который проявляется только при использовании в высоких концентрациях.

Настоящее исследование выполнено в соответствии с основным планом НИР ФГУ «СарНИИТО Росмедтехнологий».

Библиографический список

1. Белобородов, В.Б. Актуальные аспекты антимикробной терапии хирургических инфекций / В.Б. Белобородов // Инфекции в хирургии. – 2003. – №1. – С. 28-30.
2. Влияние наночастиц меди и железа на рост микробных клеток / О.А. Богословская, А.Б. Астротина, Т.А. Байтукалов, и др. // Научно-практическая конференция «Новая технологическая платформа биомедицинских исследований (биология, здравоохранение, фармацевтика)». – Ростов-на-Дону, 2006. – С. 72-73.
3. Глущенко, Н.Н. Биологическая активность ультрадисперсного порошка железа / Н.Н. Глущенко, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // 10-я Международная конференция по магнитным жидкостям. – Плес, 2002. – С. 308-312.

Таблица 2

Антибактериальное действие различных концентраций наночастиц меди на клинические штаммы золотистого стафилококка

Время воздействия, мин.	Контрольная группа (n=10)	Количество колоний на твердых питательных средах, М±m			
		Опытные группы			
		1	2	3	4
		0,001 мг/мл (n=10)	0,01 мг/мл (n=10)	0,1 мг/мл (n=10)	1 мг/мл (n=10)
30	1567±126	64,7±33,1***	36,4±18,5 ***	18,2±21,0***	Нет роста
60	1345±84	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
120	874±112	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
180	983±345	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста

Примечание: *** $p < 0,001$.

4. Глущенко, Н.Н. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенности их биологического действия / Н.Н. Глущенко, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // Нанотехнология – технология XXI века: Тез. докл. – М., 2006. – С. 93-95.

5. Аттестация и применение наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов / И.П. Арсентьева, Е.С. Зотова, Г.Э. Фолманис и др. // Нанотехника. Спец. выпуск «Нанотехнологии-медицине». – 2007. – № 2 (10). – С. 72-77.

6. Байтукалов, Т.А. Физико-химические особенности ранозаживляющих свойств наночастиц железа и магния в составе различных полимеров: Автореф. дис. ... к. х. н. / Т.А. Байтукалов. – М., 2006. – 20 с.

7. Глущенко, Н.Н. Снижение бактериальной резистентности к антибиотикам за счет их синергизма с медью / Н.Н. Глущенко, Л.А. Володина // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы II Московского международного конгресса: Тез. докл. – Ч. 1. – М., 2003. – С. 88.

8. Глущенко, Н.Н. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов / Н.Н. Глущенко, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // Химическая физика. – 2002. – Т. 21 (4). – С. 79-85.

9. Роль активных форм кислорода в медь-индуцированной проницаемости плазматической мембраны бактерий *Escherichia coli* / В.С. Лебедев, А.В. Веселовский, Е.Ю. Дейнега, Ю.И. Федоров // Биофизика. – 2002. – № 2. – С. 295-299.

УДК616.61-002.151-056.7-037-07:577.21

Оригинальная статья

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РИСКА ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТИ ПОВЫШЕННОЙ АКТИВНОСТИ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

А.А. Байгильдина – ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, доцент кафедры биологической и биоорганической химии, кандидат медицинских наук; **Д.В. Исламгулов** – Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, лаборатория молекулярной генетики человека, научный сотрудник, кандидат медицинских наук; **Ф.Х. Камиллов** – ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, заведующий кафедрой биологической и биоорганической химии, профессор, доктор медицинских наук; **Т.А. Хабелова** – ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, ассистент кафедры инфекционных болезней, кандидат медицинских наук; **И.Р. Миннихметов** – Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, лаборатория молекулярной генетики человека, аспирант.

MOLECULAR-GENETIC ASSESSMENT OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME HYPERACTIVITY DETERMINANCY RISK AT HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

A.A. Baygildina – Bashkiria State Medical University, Department of Biological and Bioorganic Chemistry, Assistant Professor, Candidate of Medical Science; **D.V. Islamgulov** – Ufa scientific centre of the RAS, Institute of biochemistry and genetics, laboratory of human molecular genetics, researcher, Candidate of Medical Science; **F.Kh. Kamilov** – Bashkiria State Medical University, Head of Department of Biological and Bioorganic Chemistry, Professor, Doctor of Medical Science; **T.A. Khabelova** – Bashkiria State Medical University, Department of Biological and Bioorganic Chemistry, Assistant, Candidate of Medical Science; **I.R. Minniakhmetov** – Ufa scientific centre of the RAS, Institute of biochemistry and genetics, laboratory of human molecular genetics, post-graduate student.

Дата поступления — 04.09.09 г.

Дата принятия в печать — 15.02.10 г. 15.02.10 г.

А.А. Байгильдина, Д.В. Исламгулов, Ф.Х. Камиллов, Т.А. Хабелова, И.Р. Миннихметов. Молекулярно-генетическая оценка риска детерминированности повышенной активности ангиотензинпревращающего фермента при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. Саратовский научно-медицинский журнал, 2010, том 6, № 1, с. 14–17.

Цель работы – изучение активности ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в сыворотке крови и полиморфизма гена рецептора ангиотензина II (AT II) 1 типа при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) как возможного предиктора заболевания. Обследованы 409 больных в возрасте от 15 до 65 лет. Активность АПФ определялась кинетически с использованием набора фирмы Bihlmann (Швейцария). Геномная ДНК из периферической крови выделялась методом фенол-хлороформной экстракции, генотипирование локусов изучаемой ДНК проводилась методом ПЦР синтеза ДНК. Статистически незначимое снижение активности АПФ наблюдается только в лихорадочный период среднетяжелой и тяжелой формы без осложнений; во все остальные периоды и при всех формах наблюдается статистически значимая гиперактивность АПФ. При тяжелой форме без осложнений наблюдаются резкие колебания активности АПФ в динамике болезни. При осложненной форме имеет место статистически значимая стабильно высокая активность фермента на всем протяжении болезни. Анализ полиморфизма гена рецептора AT II 1 типа свидетельствуют о том, что аллели *A1166 и *C1166, а также, генотипы *A1166/*A1166 и *C1166/*C1166 не ассоциированы со степенью тяжести течения ГЛПС. Повышение активности АПФ при ГЛПС не носит адаптивный характер из-за дефектов в рецепции AT II и является адекватным метаболическим ответом организма в ответ на внедрение эндотелиотропного вируса.

Ключевые слова: ангиотензинпревращающий фермент, ген рецептора ангиотензина II 1 типа, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.

A.A. Baygildina, D.V. Islamgulov, F.Kh. Kamilov, T.A. Khabelova, I.R. Minniakhmetov. Molecular-genetic assessment of angiotensin-converting enzyme hyperactivity determinancy risk at hemorrhagic fever with renal syndrome. *Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, vol. 6, № 1, p. 14–17.

The research aimed to explore the changes of angiotensin-converting enzyme (ACE) blood activity and polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene as disease predictor at hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). In examination 409 patients at the age of 15-65 years were involved. ACE blood activity with the help of Bihlmann (Switzerland) ACE kinetic test was determined. Blood genomic DNA by phenol- chloroformic extraction was isolated, genetic locuses by polymerase chain reaction of DNA synthesis were researched. It was shown that the ACE blood activity at HFRS is risen and these changes the significanter the severer form of disease. Nonsignificant rising of enzyme activity only in febric period of both ungravic and gravic forms was observed. In gravic form significant changes of ACE activity are observed, in complicated form – stable high enzyme activity during all disease took place. Analysis of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism shown that alleles *A1166 and *C1166, genotypes *A1166/*A1166 and *C1166/*C1166 are not associated with HFRS severity. Made conclusion that high ACE activity is not adaptive reaction due to defect in angiotensin II binding and it is an adequate metabolic response of an organism to endotheliotropic virus action.

Key words: angiotensin-converting enzyme, gene of angiotensin II type 1 receptor, hemorrhagic fever with renal syndrome.