

АНТИМИКРОБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ИХ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Добрейкин Е.А.¹, Тараскин А.Ф.¹, Урусова А.И.¹, Веретенников С.И.¹, Дьяконов И.Н.¹, Рогожникова Е.А.¹, Суздальцев С.Е.¹

¹ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: eadobr2014@yandex.ru

Изучена выраженность антимикробного действия наночастиц меди, низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*. Материал и методы. Выращенность антимикробного действия синтезированных наночастиц меди и лазерного излучения в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* оценивали по оптическому стандарту мутности МакФарланда смешением суточных культур. В первой серии экспериментов культуру микроорганизмов облучали две минуты аппаратом АЛТ «Матрикс», во второй серии-в культуру микроорганизмов вносили суспензию нанопорошка меди, в третьей серии сочетали облучение лазером и внесение наночастиц меди. Результаты. Отмечена низкая антибактериальная активность НИЛИ; при назначении наномеди отмечалось достоверное снижение количества колоний. Выявлен достоверный синергизм антимикробного действия сочетанного использования наночастиц меди и НИЛИ. Заключение. Сочетанное применение НИЛИ и наночастиц меди позволяет получать антибактериальный эффект при более низких концентрациях наночастиц меди, снижая тем самым возможное токсическое действие данного вещества на организм в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: антимикробная активность, лазерное излучение (НИЛИ), наночастицы меди, сочетанное применение.

ANTIMICROBIAL EFFECT OF COPPER NANOPARTICLES', LOW-INTENSITY LASER RADIATION AND THEIR COMBINED APPLICATION IN EXPERIMENT

Dobrejkin E.A.¹, Taraskin A.F.¹, Urusova A.I.¹, Dyakonov I.N.¹, Veretennikov S.I.¹, Rogozhnikova E.A.¹, Suzdaltsev S.E.¹

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street B. Kazachya, 112), e-mail: eadobr2014@yandex.ru

The aim of the investigation was to study the markedness of copper nanoparticles' and low-intensity laser radiation (LILR) antimicrobial action and to evaluate the effectiveness of their combined application *in vitro* experiment. Materials and methods. Markedness of synthesized copper nanoparticles' and laser radiation antimicrobial effect on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was evaluated according to MacFarland by mixing daily cultures. In the first series of the experiments the culture of the microorganisms was subjected to radiation for two minutes using the ALT "Matrix" apparatus; in the second series copper nanopowder suspension was introduced into the culture of the microorganisms; in the third series laser radiation and introduction of copper nanoparticles were combined. Results. Low antibacterial LILR activity was noted; reliable decrease of the number of colonies was observed at nanocopper introduction. There was revealed reliable synergism of antimicrobial action of copper nanoparticles' and LILR combined application. Conclusion. Combined application of LILR and copper nanoparticles allows to obtain antibacterial effect at lower concentrations of copper nanoparticles, thus decreasing possible toxic action of the given substance on the organism *in vivo* conditions.

Keywords: antimicrobial activity, low-intensity laser radiation (LILR), copper nanoparticles, combined application.

Лазерная медицина как прогрессивное направление медицинской науки наиболее точно оценила свое предназначение для экспериментальных исследований [1, 2, 3, 5]. Антиинфекционные механизмы действия НИЛИ отмечены во многих исследованиях [2, 7]. В литературе имеются единичные сообщения о применении наночастиц в

экспериментальной хирургии [2, 6]. При изучении антимикробного влияния наночастиц меди на грамотрицательные микроорганизмы установлено, что наибольшими свойствами обладает суспензия наночастиц меди при концентрации 1 мг/мл. Тем не менее, многие наночастицы токсичны и представляют потенциальную опасность для организма [8, 9]. Однако, работ, оценивающих сочетанную антиинфекционную активность НИЛИ и наночастиц металлов в экспериментах исследованиях до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования: изучить выраженность антимикробного действия наночастиц меди, лазерного излучения и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*. **Задачи исследования:** Определить влияние НИЛИ на культуры микроорганизмов; определить выраженность антибактериального эффекта различных концентраций наночастиц меди на культуры микроорганизмов (минимально ингибирующая концентрация); изучить антибактериальные свойства наночастиц меди различных концентраций под действием лазерного излучения.

Материал и методы

Ультрадисперсный порошок меди получали термолизом в токе оксида углерода оксалата меди. Последний синтезировали из ацетата меди и щавелевой кислоты. Таким способом удаётся получить ультрадисперсный порошок меди, состоящий из её кластеров, включающих фрагменты от 60 до 80 нм, и обладающих повышенной устойчивостью на воздухе. В ходе проведенного эксперимента проведено 256 исследований направленных на подбор дозировок и способов применения нанопорошка меди. Оптимальной признана дозировка 0,2 мл в концентрации 1000,100,10 мкг/мл в виде суспензии. Наночастицы меди помещали в стерильные пробирки известной массы для удобства дальнейшего получения стерильных суспензий заданных концентраций. В результате проведенных 52 исследований с применением лазерного аппаратом АЛТ «Матрикс», тип МЛЮ1КР нами определены параметры, пригодные для его использования, как изолированно, так и в сочетании с нанопорошком меди: частота – 80 Гц, мощность излучения – 15 мВт, длина волны – 630 нм.

Исследование антибактериального действия сочетанного применения наночастиц меди и НИЛИ. Выраженность антимикробного действия синтезированных наночастиц меди и НИЛИ в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* оценивали бактериологическими методами. Использовали стандартизованную по оптическому стандарту мутности МакФарланда суспензию микроорганизмов, полученную смешением суточных культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (по $9 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Полученную суспензию поэтапно разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации $3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

В первой серии экспериментов культуру микроорганизмов облучали две минуты аппаратом «Матрикс» в режиме: частота – 80 Гц, мощность излучения – 15 мВт, длина волны – 0,65 мкм, время облучения – 2 минуты. Во второй серии в культуру микроорганизмов вносили по 0,2 мл суспензии нанопорошков меди с конечными концентрациями 1000, 100, 10 мкг/мл. В третьей серии сочетали облучение лазером и внесение наночастиц меди. Контролем служила культура микроорганизмов без воздействий и добавок. Сразу и через 1, 2, 3 часа культивирования производили мерный высеv (по 0,1 мл) на чашки с мясо-пептонным агаром и через 24 часа инкубации при 37⁰С в условиях перемешивания (50 оборотов в минуту) подсчитывали количество выросших колоний. При проведении статистической обработки руководствовались методикой определения среднего квадратичного отклонения найденных в опыте значений, предложенной И.П. Ашмариним и А.А. Воробьевым [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что на первом этапе исследования полученные количества выросших колоний сразу после посева существенно не отличались от контроля.

Эксперимент 1-й серии. Через 1 и 2 часа культивирования после лазерного облучения отмечалось снижение количества колоний опытного штамма до ($M \pm s$) 199 \pm 10 и 1212 \pm 35 ($p < 0,05$), соответственно, однако, на третьем часе рост *Staphylococcus aureus* возобновлялся (рис. 1).

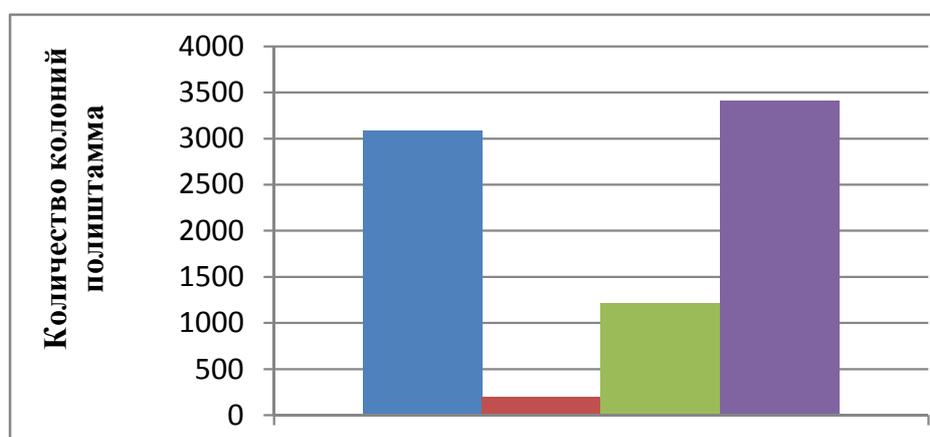


Рис. 1. Количество колоний в зависимости от времени высева после воздействия НИЛИ

Таким образом, эффективность действия лазера констатирована только в течение одного часа, а антибактериальные свойства изолированного НИЛИ признаны недостаточно эффективными.

Эксперимент 2-й серии. Через 24 часа инкубации при 37⁰С высеянных на чашки Петри микроорганизмов, предварительно культивированных 1 час в присутствии ультрадисперсного порошка меди, отмечалось достоверное снижение количества колоний до ($M \pm s$) 423 \pm 20; 1540 \pm 39 и 2446 \pm 50 ($p < 0,05$), соответственно, по сравнению с контролем,

где отмечался рост в виде газона (сплошной рост). Подобная тенденция сохранялась через 2 и 3 часа культивирования. Нанопорошок меди в концентрации 1 мкг/мл не оказывал влияния на рост опытных культур. Таким образом, в ходе исследования было показано, что опытные концентрации нанопорошков меди (1000 – 10 мкг/мл) вызывают резкое сокращение количества микробных клеток *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* уже в первые часы контакта с культурой при полном подавлении роста через 3 часа воздействия.

Третья серия экспериментов. Сочетание лазерного облучения с опытными концентрациями нанопорошков 1, 100 и 10 мкг/мл через 1 час культивирования привело к еще большему снижению количества клеток до $(M \pm s)$ 34 ± 6 ; 125 ± 11 и 2267 ± 48 с последующим отсутствием колоний уже на 2 часу культивирования в 1000 и 100 мкг нанопорошка меди. Через 3 часа рост отсутствовал в концентрациях нанопорошка 1000, 100 и 10 мкг/мл, как при воздействии облучения, так и без него (рис. 2).

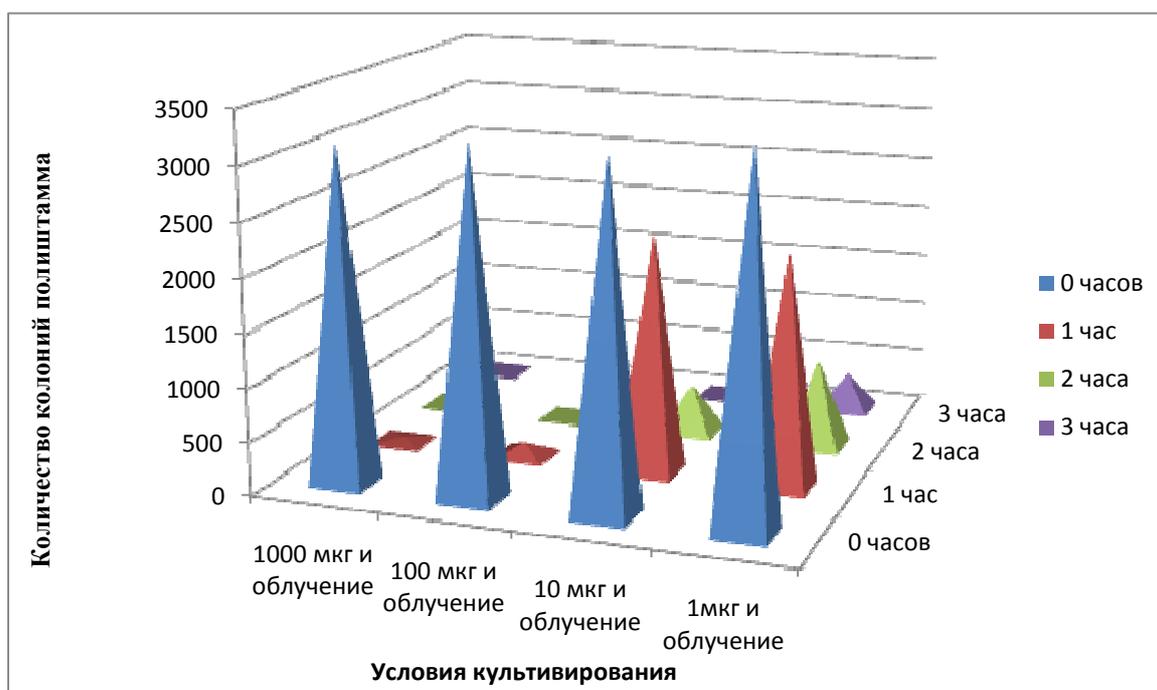


Рис. 2. Количество колоний в зависимости от времени высева после сочетанного воздействия НИЛИ и наномеди

Заключение. Установлено, что имеется позитивный потенциал антиинфекционного применения наночастиц меди, особенно при их сочетанном применении с НИЛИ. Нами установлены параметры применения НИЛИ, в ходе проведенных экспериментов были синтезированы и дозированы наночастицы, способные быть использованными в эксперименте. Полученные результаты свидетельствуют, что изолированное применение НИЛИ не обладает достаточно эффективным антибактериальным действием. При оценке результата второй серии эксперимента установлено, что опытные концентрации

нанопорошков меди (1000 – 10 мкг/мл) вызывают резкое сокращение количества микробных клеток *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* уже в первые часы контакта с культурой при полном подавлении роста через 3 часа воздействия.

В итоге эксперимента выявлен синергизм антимикробного действия сочетанного использования наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при воздействии на культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, что позволяет получать антибактериальный эффект при более низких (менее 1 мкг/мл) концентрациях наночастиц меди, снижая тем самым возможное токсическое действие данного вещества на организм в условиях *in vivo*.

Список литературы

1. Алипов В.В. Новые способы эндоскопической коррекции гастродуоденальной перфорации в экспериментальной хирургии / В.В. Алипов, А.Ф. Тараскин, Н.О. Челнокова [и др.] // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2007. – №3-4. – С. 22-24.
2. Алипов В.В. Экспериментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения при хирургическом лечении инфицированных ожоговых ран кожи / В.В. Алипов, П.А. Беляев, А.И. Урусова, Е.А. Добрейкин // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2013. – Т. VI, № 4 (21). – С. 411-417.
3. Алипов В.В., Лебедев М.С., Доронин С.Ю., Шаповал О.Г., Алипов Н.В, Лебедева Е.А. Способ комбинированного лечения абсцессов в эксперименте // Патент России 2475251. 2013. Бюл. № 5.
4. Ашмарин Н.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз., 1962. – 180 с.
5. Колсанов А.В., Алипов В.В., Лебедев М.С., Добрейкин Е.А., Лимарева Л.В. Способ моделирования термической ожоговой раны кожи у лабораторных животных // Патент России №2472232. 2013. Бюл. № 1.
6. Николенко В.Н. Перспективные нанотехнологии в области экспериментальной медицины / В.Н. Николенко, В.В. Алипов, О.А. Фомичева [и др.] // Нанотехника. – 2009. – № 19. – С. 66-68.
7. Alipov V.V. Lazer nanotechnology in experimetal surgery / V.V. Alipov // International Kongress «EuroMedica 2012». – Hannover, 2012. – P. 22-23.

8. Bystrzejska-Piotrowska G. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management / G. Bystrzejska-Piotrowska, J. Golimowski, P.L. Urban // Waste Management. – 2009. – P. 2587-2595.
9. Nishimori H. Silica nanoparticles as hepatotoxicants / H. Nishimori, M. Kondoh, K. Isoda [et al.] // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2009. – P. 496-501.

Рецензенты:

Громов М.С., д.м.н., профессор, ректор НОУ ВПО Медицинский институт «Реавиз» Саратовский филиал, г. Саратов.

Капралов С.В., д.м.н., заведующий 1-м хирургическим отделением, МУЗ «Городская клиническая больница № 2 им. В. И. Разумовского», г. Саратов.