

УДК 615.281:616-07(082)

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ВЛИЯНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ПОРОШКООБРАЗНОГО ПРЕПАРАТА

Бабушкина И. В., Пучиньян Д. М., Гладкова Е. В., Мамонова И. А., Белова С. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, e-mail: 10051968@mail.ru*

Разработан комплексный порошкообразный препарат на основе наночастиц меди, серебра и крахмала в качестве порошкообразной основы, обладающий антимикробным действием, которое доказано в условиях *in vitro* на антибиотикорезистентных штаммах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных от пациентов травматолого-ортопедического профиля. Антибактериальная активность разработанного препарата изучена в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,5 мг/мл при воздействии от 30 до 120 минут. При изучении клинических штаммов *E. coli* количество микроорганизмов после воздействия комплексного препарата во всех вариантах опыта достоверно ( $p < 0,05$ ) меньше, чем в контроле, концентрации 3 и 5 мг/мл приводили к бактерицидному эффекту при всех используемых экспозициях. Применение препарата в концентрации 0,5 мг/мл вызывало снижение количества жизнеспособных клеток *Staphylococcus aureus* при времени воздействия 30 минут до  $4,66 \pm 0,38\%$  ( $p < 0,001$ ), при инкубации в течение 60 минут – до  $0,31 \pm 0,07\%$  клеток ( $p < 0,001$ ). Дальнейшее увеличение концентрации препарата вызывало полную элиминацию микроорганизмов при всех сроках инкубации. Установлен дозо- и времязависимый характер его действия. Использование препарата для лечения инфицированных и условно-асептических ран позволит обеспечить оптимальные условия для репаративной регенерации – предотвращение вторичной контаминации ран и элиминацию контаминирующего бактериального агента.

Ключевые слова: наночастицы, медь, серебро, антибактериальное действие, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

## EXPERIMENTAL GROUNDING OF ANTIBACTERIAL INFLUENCE OF A COMPLEX POWDER MEDICATION

Babushkina I. V., Puchinyan D. M., Gladkova E. V., Mamonova I. A., Belova S. V.

*Federal State Budget Institution «Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saratov, e-mail: 10051968@mail.ru*

A complex powder medication consisting of copper, silver and amyllum nanoparticles was worked out as a powder basis with antimicrobial properties which were proved *in vitro* on antibiotics resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* obtained from traumatologic and orthopedic patients. Antibacterial activity of the medication is studied in the range of 0.1-0.5 mg/ml concentrations under the influence length from 30 to 120 minutes. The study of *E. coli* clinical strains showed that microorganisms number after the influence in all experimental variants is significantly ( $p < 0.05$ ) lower than in control group. Concentrations of 3 and 5 mg/ml had antibacterial effect in all expositions used. The use of the medication in 0.5 mg/ml concentrations caused the decrease of *Staphylococcus aureus* viable cells number with the influence length of 30 minutes up to  $4.6 \pm 0.38\%$  ( $p < 0.001$ ), the incubation period of 60 minutes - up to  $0.31 \pm 0.07\%$  ( $p < 0.001$ ). Further increase of medication concentration caused full microorganisms elimination at all incubation periods. The correlation between its action, time and dose was also established. Its application for infected and conditionally aseptically wounds allow providing effective conditions for reparative regeneration – prevention of wounds' secondary contamination and contaminating bacterial agent elimination.

Keywords: nanoparticles, copper, silver, antibacterial action, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Современная концепция лечения раневой инфекции основана на проведении радикальной хирургической обработки очага инфекции, дополненной общей и местной антимикробной терапией, но применение антибиотиков может препятствовать заживлению раны, подавляя воспалительную реакцию и угнетая иммунитет. Быстрый рост устойчивости микроорганизмов не только к антибиотикам, но и ко многим антисептикам, является

сложной проблемой, которая на сегодняшний день приобрела социально-экономическую значимость в масштабах государства [6].

В России преобладающими возбудителями гнойно-воспалительных осложнений в травматологии и ортопедии являются грамположительные кокки. Штаммы *E. coli*, выделенные у пациентов с патологией опорно-двигательного аппарата, характеризуются высоким уровнем резистентности к антимикробным препаратам, обусловленной продукцией бета-лактамаз расширенного спектра [4].

Наночастицы металлов являются одним из перспективных претендентов на создание нового класса антибактериальных средств, так как обладают пролонгированным бактерицидным, фунгицидным и регенеративным действиями [1, 3]. Наночастицы серебра и меди обладают более выраженным антимикробным эффектом, чем профильные антибиотики. Антибактериальный эффект наночастиц металлов обусловлен нарушением барьерной функции клеточной мембраны микроорганизма [2, 7,8].

Актуальным представляется оценка антибактериального влияния местного применения наночастиц меди и серебра в комплексе с порошковой основой. В состав уже применяемых порошкообразных препаратов входят антибиотики, поэтому не исключено возникновение всех перечисленных негативных последствий – селекции антибиотикорезистентных штаммов, местных аллергических реакций, и как следствие, нарушения полноценной репаративной регенерации ран [5].

В состав предлагаемого препарата были включены наночастицы серебра и меди, что может обеспечить высокую антимикробную эффективность, значительно уменьшить возможность развития гнойных осложнений и оптимизировать процесс репаративной регенерации ран мягких тканей.

**Целью работы** является разработка комплексного препарата, состоящего из наночастиц меди, серебра и порошкообразной основы, обладающего антибактериальным действием и предназначенного для санации условно-асептических и гнойных ран, и выяснение уровня и спектра антибактериальной активности препарата на клинических штаммах грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

#### **Материалы и методы исследования**

Разработан препарат для регенерации мягких тканей с антибактериальным эффектом, имеющий порошкообразную форму и содержащий наночастицы меди с дисперсностью 30–40 нм, наночастицы серебра с дисперсностью 30–70 нм, порошкообразный стерильный крахмал. Используются наночастицы меди и серебра (ТУ 1733-056-00209013-2008), синтезированные на плазмохимическом комплексе филиала ФГУП РФ «Государственный

научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (г. Москва).

Антимикробную активность препарата изучали на 40 антибиотикорезистентных штаммах микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого пациентов травматолого-ортопедического профиля с посттравматическими и послеоперационными осложнениями, находящимися на лечении в ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, 20 из которых относятся к *E. coli*, 20 – к *S. aureus*. Штаммы микроорганизмов, используемые в работе, коллекционировали и хранили в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляли по общепринятой методике (Приказ МЗ СССР, № 535). Забор материала проводили в асептических условиях стерильными тампонами Transportswabw/omedium (Citoswab, China) и высевали на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды. Микроорганизмы идентифицировали на микробиологическом анализаторе BD BBL™ Crystal™ AutoReader (BectonDickinson, США) с применением панелей Crystal™Enteric/NonfermenterIDKit (BectonDickinson, США), Crystal™Gram-PositiveIDKit (BectonDickinson, США). Для пробоподготовки использовали Densi-La-Meter (Pliva-LachemaDiagnostika, Чехия), предназначенный для определения мутности разведения микроорганизмов в единицах по МакФарланду (от 0,0 до 15). 1 МакФарланд эквивалентен  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл.

С каждым выделенным штаммом микроорганизмов проведены две серии экспериментов: 1-я серия (группы сравнения) – с взвесью кукурузного крахмала в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 мг/мл в 0,9%-ном растворе хлорида натрия (pH 7,2-7,4); 2-я серия (опытные группы) – с взвесью комплексного порошкообразного препарата в концентрациях 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 мг/мл в 0,9 % растворе хлорида натрия (pH 7,2-7,4).

Изучение антибактериальной активности наночастиц металлов проводили в соответствии с МУК 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

Для приготовления бактериальной взвеси использовали чистую суточную культуру микроорганизмов в стерильном 0,9 %-ном растворе хлорида натрия. На нефелометре доводили плотность бактериальной взвеси до 0,1 ЕД по стандарту Мак-Фарланда, что соответствует  $3 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. По 100 мкл бактериальной взвеси вносили во все опытные и контрольную пробирки, конечная концентрация составляла  $3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл.

Полученную взвесь инкубировали 30, 60, 90 и 120 минут в термошейкере SkyLineST-3 (ELMI, Латвия) при температуре 37 °С и встряхивании 100 об/мин, после чего по 100 мкл каждого образца высевали на чашки Петри с питательной средой Agarnutrient

(BectonDickinson, США) и помещали в термостат при 37 °С на 24 часа. На следующий день производили подсчет выросших колоний.

Статистический анализ позволил подтвердить достоверность полученных результатов. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием критерия Колмогорова – Смирнова, коэффициентов асимметрии и эксцесса. Оценку различий между выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента, так как переменные соответствовали нормальному распределению.

В анализе использованы следующие статистические показатели: n – число наблюдений; M – среднее арифметическое значение; m – среднеквадратическая ошибка; p – коэффициент достоверности. Достоверным считали результаты при  $p < 0,05$ , что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

### Результаты исследований

При культивировании клинических штаммов *E. coli* на агаризованных питательных средах количество микроорганизмов после воздействия комплексного препарата во всех вариантах опыта меньше, чем в контроле. Результаты исследований представлены в табл. 1. Действие препарата в концентрации 0,1 мг/мл во всех временных экспозициях вызывало существенное уменьшение количества колоний изучаемого микроорганизма: экспозиция 30 минут способствовала сокращению количества жизнеспособных бактерий до  $54,82 \pm 2,36$  % ( $p < 0,001$ ), 60 минут – до  $68,70 \pm 6,34$  % ( $p < 0,001$ ), 90 минут – до  $58,81 \pm 4,91$  % ( $p < 0,001$ ), 120 минут – до  $28,27 \pm 4,56$  % ( $p < 0,001$ ).

Концентрация 0,5 мг/мл при экспозициях 30, 60, 90 минут способствовала снижению количества бактериальных клеток до  $22,97 \pm 6,25$  % ( $p < 0,001$ ),  $17,04 \pm 3,55$  % ( $p < 0,001$ ) и  $8,7 \pm 1,12$  % ( $p < 0,001$ ) соответственно. Инкубация в течение 120 минут приводила к незначительному росту количества микроорганизмов –  $0,2 \pm 0,8$  % ( $p < 0,001$ ).

Дальнейшее повышение концентрации препарата до 3 и 5 мг/мл при всех экспозициях приводило к отсутствию роста микроорганизмов на плотных питательных средах.

Таблица 1

Антибактериальное действие комплексного порошкообразного препарата на штаммы *E. coli*

Время воздействия, мин.	Количество колоний на агаризованных питательных средах (КОЕ), M±m					
	Контрольная группа, n=20	Опытные группы, n=20				
		0,1 мг/мл	0,5 мг/мл	1 мг/мл	3 мг/мл	5 мг/мл
30	1256,34±18,21	689,74±19,27 $p < 0,001$	288,31±18,56 $p < 0,001$	116,33±8,50 $p < 0,001$	Роста нет	Роста нет
60	1156,14±22,31	756,68±35,64 $p < 0,05$	197,59±23,11 $p < 0,001$	54,07±8,11 $p < 0,001$	Роста нет	Роста нет

90	987,56±19,25	577,31±26,48 p<0,001	79,16±12,05 p<0,001	8,12±1,26 p<0,001	Роста нет	Роста нет
120	1145,07±27,34	329,45±27,11 p<0,001	7,27±3,14 p<0,001	2,03±0,37 p<0,001	Роста нет	Роста нет

Примечание: М – среднее арифметическое значение;  $\pm m$  – среднеквадратическая ошибка; p – показатель достоверности различий опытной группы по сравнению с группой контроля; n – количество наблюдений.

Полученные данные продемонстрированы в виде диаграммы (рис. 1).

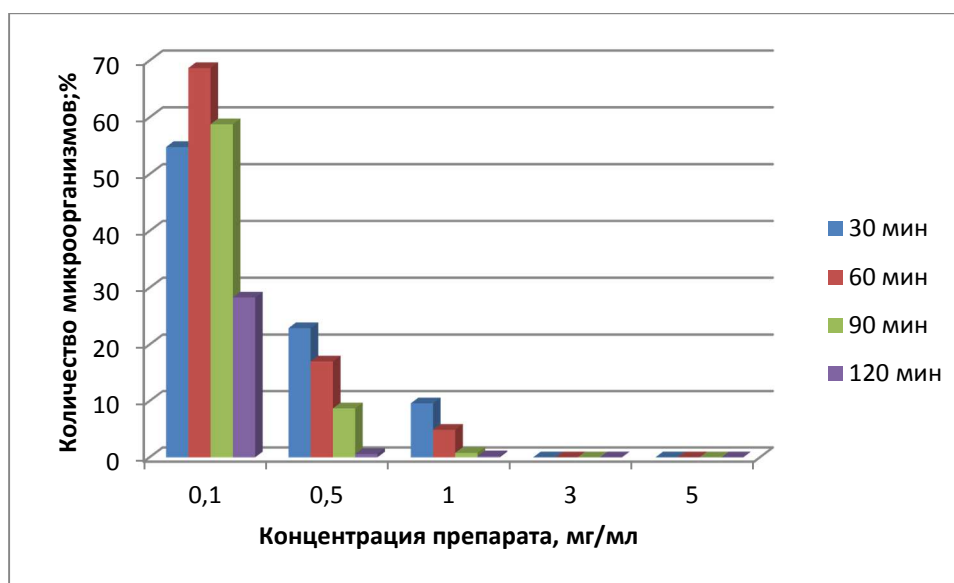


Рис.1. Антибактериальная активность комплексного препарата по отношению к штаммам *E.coli*

Таким образом, установлена высокая антибактериальная активность комплексного порошкообразного препарата в отношении антибиотикорезистентных штаммов *E. coli*. Увеличение концентрации препарата и времени воздействия приводит к усилению его антибактериальной активности, что свидетельствует о время- и дозозависимом характере их действия. Использование препарата в концентрациях 3 и 5 мг/мл приводило к бактерицидному эффекту при всех используемых экспозициях.

Оценено антибактериальное действие порошкообразного препарата в концентрациях 0,1;1;3;5мг/мл на 20 штаммах *S. aureus* при различном времени воздействия. При культивировании микроорганизмов на плотной питательной среде их количество после воздействия препарата во всех вариантах опыта было меньше, чем в контроле. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Концентрация препарата 0,1 мг/мл при экспозициях в 30, 60, 90 минут приводила к снижению количества жизнеспособных клеток до  $28,37\pm 7,61$  % ( $p<0,001$ ) по отношению к

контролю. При пролонгировании инкубации до 120 минут происходило полное отсутствие роста изучаемых микроорганизмов.

Таблица 2

Антибактериальное действие порошкообразного комплексного  
препарата на штаммы *S. aureus*

Время воздействия, мин.	Количество колоний на плотных питательных средах (КОЕ), М±m					
	Контрольная группа, n=20	Опытные группы, n=20				
		0,1 мг/мл	0,5 мг/мл	1 мг/мл	3 мг/мл	5 мг/мл
30	1264,38±29,18	349,54±26,37 p<0,001	56,49±4,37 p<0,001	Роста нет	Роста нет	Роста нет
60	1340,15±21,08	71,18±9,65 p<0,001	4,31±1,08 p<0,001	Роста нет	Роста нет	Роста нет
90	1171,39±32,62	7,40±2,36 p<0,001	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет
120	1055,81±19,79	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет

Примечание: то же, что и в табл. 1.

Применение препарата в концентрации 0,5 мг/мл приводило к более выраженной антибактериальной активности: количество жизнеспособных клеток при времени воздействия 30 минут составило 4,66±0,38 % (p<0,001), при инкубации в течение 60 минут жизнеспособными оставалось лишь 0,31±0,07 % клеток (p<0,001). Дальнейшее увеличение концентрации препарата вызывало полную элиминацию микроорганизмов при всех сроках инкубации. Полученные данные представлены в виде диаграммы (рис. 2).

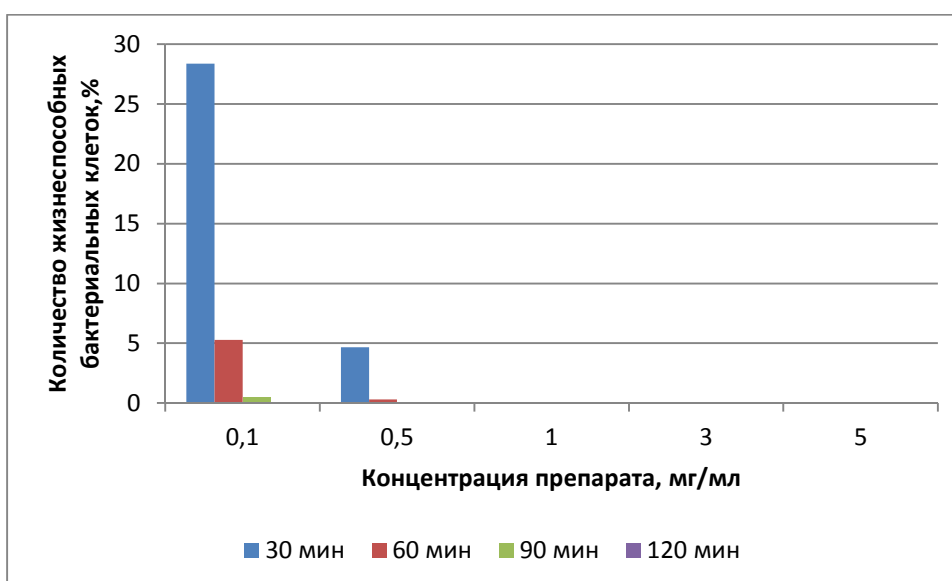


Рис. 2. Антибактериальная активность препарата на основе наночастиц меди и серебра по отношению к штаммам *S. Aureus*

В результате проведенных исследований выявлен выраженный антибактериальный эффект порошкообразного комплексного препарата на основе наночастиц меди и серебра в отношении антибиотикорезистентных штаммов *S.aureus* при их применении в низких концентрациях. Установлен дозозависимый характер его действия. Выявлена прямо пропорциональная зависимость антибактериального действия препарата от времени воздействия.

### **Выводы**

Разработанный препарат создает оптимальные условия для реализации основных лечебных компонентов – наночастиц меди (как средства, обладающего антибактериальным и регенерирующим действием) и серебра (как антибактериального средства), позволяет предотвратить вторичное инфицирование раны, в отличие от известных аналогов осуществить купирование имеющихся гнойных процессов в ране, завершить процесс регенерации в более короткие сроки.

### **Список литературы**

1. Бабушкина И. В., Гладкова Е. В., Мамонова И. А. Биологическая активность наночастиц меди в эксперименте // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 6. – С. 1204-1207.
2. Бабушкина И. В., Мамонова И. А., Гладкова Е. В. Этиологическая роль возбудителей хронического остеомиелита и влияние наночастиц металлов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. – 2014. – № 2. – С. 52-56.
3. Бабушкина И. В., Мамонова И. А., Гладкова Е. В. Использование наночастиц металлов для снижения бактериальной обсемененности экспериментальных гнойных ран // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – Т. 158, № 11. – С. 645-648.
4. Гостев В. В., Науменко З. С., Мартель И. И. Антибиотикорезистентность микрофлоры ран открытых переломов // *Травматология и ортопедия России*. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 33-37.
5. Зорин А. Н., Гузей Т. Н. Клинический опыт применения препарата банеоцин в терапии инфекционных поражений кожи // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2005. – № 1. – С. 65–67.

6. Привольнев В. В., Каракулина Е. В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – № 3. – С. 214–222.
7. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu [et al.] // Nanomedicine. – 2007. – V. 3, Issue 1. – P. 95-101.
8. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles / J. Remyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikan [et al.] // Materials letters. – 2012. – V. 71. – P. 114-116.