

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ПОКРЫТИЙ,
СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА, В ОТНОШЕНИИ
ПОЛИАНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

1, 2
1
2
Тапальский Д. В., Козлова А. И., Петровская Т. А.,
3
3
Ярмоленко М. А., Рогачев А. А.

1
Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

2
Государственное учреждение
«Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

3
Учреждение образования
«Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»
г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Распространение устойчивости среди бактерий, возбудителей госпитальных инфекций, представляет значительную угрозу для здравоохранения и требует разработки новых препаратов для проведения эффективной этиотропной терапии. Еще одной, недавно осознанной медицинской проблемой, является формирование бактериальных биопленок на поверхности внедряемых во внутреннюю среду организма металлических и полимерных конструкций, с дальнейшим развитием послеоперационных инфекционных осложнений, лечение которых затруднительно и часто требует удаления имплантата. Предотвращение образования биопленок является основной задачей в профилактике имплантат-ассоциированных инфекций [2].

Для достижения бактерицидного эффекта на микроорганизмы в составе биопленок требуются концентрации антибактериальных препаратов в 500–5000 раз превышающие минимальные ингибирующие концентрации для конкретных микроорганизмов, рассчитанные *in vitro* [6]. Используемое системное назначение антибиотиков широкого спектра порождает проблемы, связанные с селекцией и распространением полирезистентных штаммов микроорганизмов, например, метициллинрезистентных *S.aureus* и карбапенемрезистентных *P. aeruginosa*. Поэтому активно исследуются альтернативные стратегии профилактики [3].

Одним из достижений современных нанотехнологий является разработка и внедрение в производство различных методов синтеза наночастиц металлов. Наибольшее развитие получили исследования свойств наночастиц серебра. Импульсом к этому послужили хорошо известные биоцидные свойства металлического серебра. Предполагалось, что эти свойства могут быть многократно усилены за счет специфических особенностей наночастиц (обусловленных их малыми размерами и развитой удельной поверхностью), что позволит создать биоцидное средство нового типа, эффективное в очень малых дозах, экологически более чистое, чем любой из известных химических биоцидов, и обладающее широким спектром антимикробного действия. Это предположение полностью подтвердилось в экспериментах [5].

Наиболее перспективным является использование наноразмерных (5–20 нм) частиц серебра. Показана высокая бактерицидная активность наночастиц серебра в отношении эталонных штаммов микроорганизмов (в первую очередь, эшерихий и стафилококков), однако механизмы их повреждающего действия на бактериальную клетку остаются недостаточно изученными [4].

Применение плазмохимического метода для осаждения металлополимерных покрытий из активной газовой фазы является перспективным методом синтеза пленочных материалов. В зависимости от природы диспергируемых веществ, условий и режимов процессов

генерации газовой фазы и осаждения продуктов диспергирования возможно образование конденсированных слоев с различной морфологией, молекулярной структурой. В частности, при определенных режимах имеет место осаждение композиционных слоев с равномерно распределенным в его объеме низкомолекулярными соединениями или наноразмерными частицами металлов [1]. При реализации процесса плазмохимического осаждения наночастиц металлов соблюдается требование стерильности (процесс осаждения покрытия происходит в вакууме) и предоставляется возможность синтеза систем с заданным составом и структурой.

Цель

Определить выраженность и спектр бактерицидной активности наноразмерных частиц серебра, нанесенных плазмохимическим методом в виде тонких пленочных покрытий, в отношении антибиотикочувствительных и полиантибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов различных таксономических групп.

Методы

Для нанесения антибактериальных покрытий использовали порошок нитрата серебра (AgNO_3). В качестве материала подложек использовали пленки металлизированного лавсана и кварцевые пластины (для проведения спектроскопических исследований), пластины монокристалла кремния (для микроскопических исследований) и отрезки стерильной марли (для микробиологических исследований).

Покрытия формировали в вакууме из активной газовой фазы, образованной продуктами электронно-лучевого диспергирования AgNO_3 . Процесс осаждения покрытий производился с помощью устройства, схема которого представлена на рисунке 1.

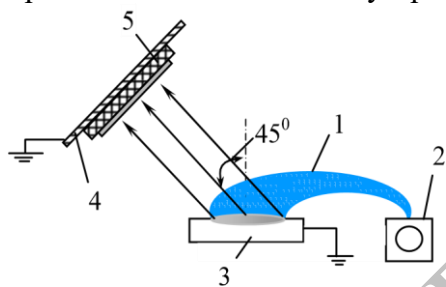


Рисунок 1 — Схема осаждения покрытий из активной газовой фазы 1 — электронный луч; 2 — электронно-лучевой прожектор с поворотом луча на 180° ; 3 — тигель с диспергируемым веществом; 4 — подложкодержатель; 5 — подложка.

В качестве источника электронов использовался электронно-лучевой прожектор с катодом прямого накала, позволяющий формировать пучки с плотностью тока $I = 50 \div 500 \text{ А/м}^2$, энергией частиц $E = 0,1 \div 2,5 \text{ кэВ}$, площадью пятна $S = (1 \div 5) \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$ с возможностью поворота луча на 180° . Для поворота луча применялось постоянное магнитное поле. Поток электронов направлялся на тигель с диспергируемым материалом.

Исследование молекулярной структуры нанесенных покрытий производили на ИР-спектрофотометре Vertex-70 (Bruker).

Для исследования морфологии покрытия и определения размеров наночастиц использовался сканирующий микроскоп Solver P47 PRO в полуконтактном режиме.

Для определения бактерицидной активности готовили в ряд пробирок с 5 мл триптиказосевого бульона и вносили в них суточные культуры микроорганизмов до конечных концентраций 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 и 10^9 микробных клеток/мл. Концентрацию микроорганизмов контролировали с помощью денситометра в единицах оптической плотности по МакФарланду. Тестировали бактериальные культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (антибиотикочувствительный), *S. aureus* ATCC 35591 (метициллинрезистентный), *E. coli* ATCC 25922 (антибиотикочувствительный), *E. coli* ESBL CTX M-3 (продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра CTX-M), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (антибиотикочувствительный), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра SHV), *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 27853 (антибиотикочувствительный), P. aeruginosa 257 MBL VIM (мультиантибиотикорезистентная, продуцирующая метало-бета-лактамазу), Salmonella Typhimurium ATCC 13311, Shigella sonnei ATCC 29930, Candida albicans ATCC 10231, C. cruzei ATCC 6258.

В пробирки с микроорганизмами вносили кусочки марли (25 мг на пробирку), содержащие наночастицы Ag. Пробирки с питательной средой, микроорганизмами и исследуемыми образцами марли встряхивали на шейкере 30 минут. Концентрация наночастиц Ag в питательной среде измерялась на масспектрофотометре и составила 75–80 мг/л.

Посевы инкубировались 24 ч при 37 °С, наличие роста оценивалось визуально и по оптической плотности с помощью денситометра.

Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц Ag определены методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона. Тестирование проводилось в 96луночных плоскодонных полистироловых планшетах в диапазоне концентраций наночастиц Ag 0,125–4,0 мг/л.

Для изучения устойчивости бактерицидного эффекта сформированных тонких пленочных покрытий к вымыванию проводили циклическую отмывку образцов стерильным подогретым до 37°С изотоническим раствором хлорида натрия. Проведено исследование четырех однотипных образцов с различным количеством циклов отмывки: образец 1–5 циклов, образец 2–10 циклов, образец 3–20 циклов, образец 4–40 циклов. После выполнения отмывки исследуемые образцы вносили в пробирки с 5 мл стерильного бульона Мюллера-Хинтона (МХБ), встряхивали на шейкере в течение 5 мин для лучшей диффузии наночастиц с поверхности образцов в питательную среду. В качестве контроля дополнительно использовали МХБ с образцом, не подвергавшимся отмывке, и МХБ без образца (контроль роста). В пробирки автоматической пипеткой вносили 100 мкл бактериальной суспензии S.aureus ATCC 25923 (посевная доза составила $1,5 \times 10^7$ микробных клеток). Посевы инкубировали 24 ч при температуре 37°С. Наличие роста оценивали визуально по проявлению диффузного помутнения.

Результаты

На рисунке 2 представлены результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ) сформированных тонкопленочных покрытий, содержащих наночастицы серебра.

Покрытие представляет собой фрактальные образования с большим количеством мелких сферических частиц. Средний диаметр и высота частиц не превышает 30 и 10 нм соответственно.

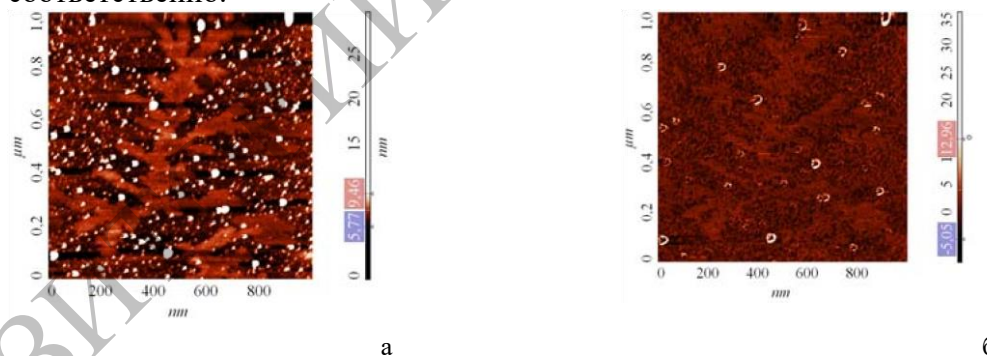


Рисунок 2 — АСМ изображения покрытий, содержащих наночастицы серебра: а — топография; б — фазовый контраст

Толщина нанесенного покрытия, оцененная с помощью растровой электронной микроскопии, не превышала 0,1 мкм.

Выявлено выраженное бактерицидное действие исследованного покрытия в отношении всех тест-культур. Рост E.coli ESBL CTX M-3, P.aeruginosa ATCC 27853, P.aeruginosa 257 MBL VIM и S.sonnei ATCC 29930 отсутствовал в пробирках с исходной концентрацией микроорганизмов от 10^5 до 10^8 клеток/мл. Для S.aureus ATCC 25923 и E.coli ATCC 25922 бактерицидный эффект отмечен при исходных концентрациях микробных клеток от 10^5 до 10^7 в 1 мл. Для остальных тест-культур бактерицидный эффект отмечен при исходных концентрациях микробных клеток от 10^5 – 10^6 в 1 мл, при исходной концентрации 10^7

клеток/мл бактерицидный эффект отсутствовал, но оптическая плотность бактериальной суспензии не увеличивалась после 24 ч инкубации (бактериостатический эффект).

Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц Ag для исследуемых тест-культур находились 0,5–4 мг/л для различных микроорганизмов.

В опыте с многократным циклическим вымыванием наночастиц из пленочных покрытий обнаружено, что образцы сохраняли свой бактерицидный эффект в отношении *S.aureus* ATCC 25923 (полное подавление видимого роста тест-культуры) после 5, 10 и 20 циклов отмывки.

Выводы

1. Разработана технология формирования покрытий, содержащих наночастицы серебра, и показана их выраженная бактерицидная активность в отношении всех исследованных контрольных культур бактерий и грибов.
2. Обнаруженный бактерицидный эффект является универсальным и не зависит от чувствительности — устойчивости протестированных микроорганизмов к антибиотикам.
3. Диффузия наночастиц из тонких пленок на поверхности образцов в раствор является протяженным во времени процессом, что является предпосылкой для длительного поддержания бактерицидных концентраций и подавления роста и размножения полиантибиотикорезистентных микроорганизмов.
4. Показана потенциальная возможность использования разработанных покрытий для локального антимикробного лечения инфекций, вызванных полиантибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Рогачев, А. А.* Морфология и молекулярная структура наноразмерных металлсодержащих покрытий ПТФЭ, формируемых из активной газовой фазы / А. А. Рогачев, М. А. Ярмоленко, А. В. Рогачев // *Материалы, технологии и инструменты*. — 2006. — Т. 11, № 4. — С. 51–55.
2. *Darouiche, R. O.* Antimicrobial coating of devices for prevention of infection: principles and protection / R. O. Darouiche // *International journal of artificial organs*. — 2007. — Vol. 30, № 9. — P. 820–827.
3. *Jansen, B.* Prevention of biofilm formation by polymer modification / B. Jansen, W.Kohnen // *J Ind Microbiol*. — 1995. — Vol. 15. — P. 391–396.
4. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J. R. Morones [et al.] // *Nanotechnology*. — 2005. — Vol. 16. — P. 2346–2353.
5. *Rai, M.* Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // *Biotechnology Advances*. — 2009. — Vol. 27. — P. 76–83.
6. Electric current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms from surgical stainless steel / A. J. Van der Borden [et al.] // *Appl Environ Microbiol*. — 2004. — Vol. 70. — P. 6871–6874.