



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.11.3.013>
УДК 546.56+546.23]-022.532:615.281.9.015.8



Довнар Р.И.¹✉, Смотров С.М.¹, Ануфрик С.С.², Анучин С.Н.², Довнар И.С.¹, Иоскевич Н.Н.¹

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

Наночастицы меди и селена как новое средство борьбы с антибиотикорезистентными патогенными микроорганизмами

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Довнар Р.И. – концепция и дизайн исследования; Довнар Р.И., Иоскевич Н.Н., Смотров С.М. – написание статьи, внесение изменений в текст; Довнар Р.И., Ануфрик С.С., Анучин С.Н., Довнар И.С. – проведение эксперимента, обработка материалов, оценка результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фотоника и электроника для инноваций», задание «Антибактериальные и ранозаживляющие свойства наночастиц металлов при индивидуальном и комбинированном воздействии лазерным излучением» (номер государственной регистрации в БелИСА 20212452 от 15.06.2021). Авторы не получали финансовой поддержки от компаний-производителей.

Подана: 22.04.2022

Принята: 05.09.2022

Контакты: dr_ruslan@mail.ru

Резюме

Введение. Все более возрастающая антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов является тревожным знаком современной хирургии. Наличие устойчивости к антибиотикам удлиняет сроки госпитализации пациентов, увеличивает заболеваемость и смертность, повышает затраты на здравоохранение. Так, в Республике Беларусь ежегодные потери вследствие наличия антибактериальной резистентности микроорганизмов составляют от 93,5 до 131,5 млн белорусских рублей.

Цель. Изучение количественных характеристик антибактериального действия наночастиц меди и селена по отношению к клиническим полиантибиотикорезистентным штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Материалы и методы. Противомикробное действие наночастиц меди и селена исследовалось на двух штаммах грамположительных бактерий – *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus*, а также пяти штаммах грамотрицательных бактерий – *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Антибактериальные свойства данных наночастиц изучались с помощью метода серийных разведений в жидкой питательной среде. В качестве способа синтеза наночастиц меди и селена был использован метод лазерной абляции в жидкости.

Результаты. Проведенные исследования продемонстрировали, что наночастицы меди и селена обладают выраженным противомикробным действием по отношению к клиническим патогенным штаммам как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Учитывая наличие полиантибиотикорезистентности у данных штаммов, применение наночастиц исследованных элементов является перспективным направлением в хирургии, особенно в случае гнойных процессов, вызванных полирезистентной, смешанной или трудно поддающейся лечению микрофлорой.

Выводы. Наночастицы меди и селена являются уникальным классом веществ, проявляющих выраженную антибактериальную эффективность в отношении полиантибиотикорезистентной микрофлоры, что показывает возможность их широкого применения в различных областях хирургии в будущем.

Ключевые слова: антибактериальное действие, наночастицы меди, наночастицы селена, метод лазерной абляции, полиантибиотикорезистентность, минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация

Dovnar R.¹✉, Smotryn S.¹, Anufrik S.², Anuchin S.², Dovnar I.¹, laskevich N.¹

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

Copper and Selenium Nanoparticles as a New Tool against Antibiotic-Resistant Pathogenic Microorganisms

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Dovnar R. – concept and design of the study; Dovnar R., laskevich N., Smotryn S. – writing the article, editing the text; Dovnar R., Anufrik S., Anuchin S., Dovnar I. – conducting the experiment, processing materials, evaluating the results of the study.

Funding. The work was carried out within the framework of the state program of scientific research Photonics and electronics for innovation, the task Antibacterial and wound healing properties of metal nanoparticles under individual and combined exposure to laser radiation (state registration number in BellSA 20212452 dated 15.06.2021). The authors did not receive financial support from manufacturing companies.

Submitted: 22.04.2022

Accepted: 05.09.2022

Contacts: dr_ruslan@mail.ru

Abstract

Introduction. Increasing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms is an alarming sign of modern surgery. The presence of antibiotic resistance lengthens hospital stays, increases morbidity and mortality, and increases healthcare costs. Thus, in the Republic of Belarus, annual losses due to the presence of antibacterial resistance of microorganisms range from 93.5 to 131.5 million Belarusian rubles annually.

Purpose. To study quantitative characteristics of antibacterial action of copper and selenium nanoparticles against clinical polyantibiotic-resistant strains of gram-positive and gram-negative bacteria.

Materials and methods. The antimicrobial effect of copper and selenium nanoparticles was studied on two gram-positive strains: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* and five strains of gram-negative bacteria: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial properties of these nanoparticles were studied using the method of serial dilutions in a liquid nutrient medium. The laser ablation in liquid was used as a method of synthesizing copper and selenium nanoparticles.

Results. The conducted studies have demonstrated that copper and selenium nanoparticles exhibit a pronounced antimicrobial effect against clinical pathogenic



strains of both gram-positive and gram-negative microorganisms. Given the presence of polyantibiotic resistance in these strains, the use of nanoparticles of the studied elements is a promising direction in surgery, especially in case of purulent processes caused by multiresistant, mixed or difficult to treat microflora.

Conclusions. Copper and selenium nanoparticles represent the unique class of substances exhibiting pronounced antibacterial efficacy against polyantibiotic-resistant microflora, which suggests the possibility of their wide application in various fields of surgery in the future.

Keywords: antibacterial action, copper nanoparticles, selenium nanoparticles, laser ablation method, polyantibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

■ ВВЕДЕНИЕ

Антибактериальной резистентностью является устойчивость микроорганизмов к противомикробному агенту, к которому они изначально были чувствительны [1]. В настоящее время устойчивость высеваемых микроорганизмов к антибиотикам при различных гнойных процессах в хирургии может достигать 80–100%, что удлинняет госпитализацию, повышает заболеваемость и смертность [2]. По подсчетам американских ученых, экономические потери в США вследствие наличия антибиотикорезистентности микроорганизмов составляют ежегодно 55 млрд долларов, а в странах Латинской Америки происходит потеря 1,2% валового внутреннего продукта [3]. Республика Беларусь из-за антибактериальной устойчивости теряет от 93,5 до 131,5 млн рублей ежегодно (от 36,2 до 51,0 млн долларов США) [4].

Бактериальная резистентность к антибиотикам может быть вызвана как случайными генетическими мутациями, так и горизонтальным переносом генов [5]. Горизонтальный перенос генов, или передача генетического материала микроорганизму, не являющемуся потомком, может происходить тремя путями: трансформацией – поглощением экзогенной ДНК, трансдукцией с помощью вирусов и путем конъюгации, требующей физического межклеточного контакта бактерий через пили или адгезины, в этом случае ДНК передается плазмидами от клетки-донора к клетке-реципиенту [5]. К примеру, β -лактамазы передаются плазмидами и способны переноситься между различными видами бактерий [6]. Другим важным механизмом приобретения антибактериальной резистентности микроорганизмами является образование биопленки – конгломерата бактерий, расположенных на поверхности, клетки которых прикреплены друг к другу. Биопленки формируются на поверхности раздела сред, прикреплены к твердой поверхности и состоят из межклеточного матрикса, покрывающего сообщество бактериальных клеток и защищающих их от воздействия антибиотиков [7]. Именно поэтому одной из основных задач современных биомедицинских исследований является разработка антибактериальных препаратов, способных бороться со штаммами, образующими биопленку, и штаммами с множественной лекарственной устойчивостью.

Основная проблема борьбы с антибиотикорезистентностью заключается в том, что способность микроорганизмов приспосабливаться к изменяющимся условиям внешней среды является эволюционно выработанным явлением. Именно поэтому полностью искоренить данную устойчивость, ориентируясь только на применяемые антибиотики, невозможно, ее можно только замедлить.

Перспективным направлением является применение новых классов веществ, которые обладают иным механизмом действия и с которыми эволюционно микроорганизмы не контактировали. К данному классу веществ можно отнести наночастицы. Их изучение в течение последнего десятилетия вызывает огромный интерес у исследователей. Связано это с тем, что вещества в нанометровом диапазоне (от 1 до 100 нм) имеют огромную удельную площадь поверхности в сравнении с цельным образцом. Большая площадь поверхности наночастиц значительно расширяет диапазон вероятного взаимодействия с биоорганическими веществами, присутствующими на живой клетке либо внутри нее [8]. В результате существенно увеличивается реакционная способность наночастиц, что может порой непредсказуемо изменять свойства материала [9].

К преимуществам применения наночастиц в сравнении с антибиотиками либо другими препаратами следует отнести их значительно меньшую токсичность, термостойкость, сильную активность даже при небольших концентрациях [10]. Все это обуславливает возможность их потенциально широкого применения в качестве терапевтических, диагностических, хирургических устройств и антимикробных агентов на основе достижений наномедицины [9, 10].

Наночастицы таких элементов, как медь и селен, относятся к особой группе материалов, обладающих уникальными свойствами и потенциально широкими возможностями применения в различных сферах жизнедеятельности людей. К примеру, наночастицы меди в настоящее время широко применяются в различных областях: системы очистки воды, катализ, преобразование и хранение энергии, биомедицинские сферы, экология и ряд других [11, 12]. Селен является важным микроэлементом, необходимым кофактором для многих белков и ферментов организма человека, он также необходим для правильного функционирования мышечной системы [13]. Соединения селена обладают противораковой активностью и низкой токсичностью [14, 15]. При этом токсичность наночастиц селена ниже, чем у его соединений [16]. Селен также является эффективным антиоксидантом, который может инактивировать активные формы кислорода в организме и защищать клетки от процессов старения и апоптоза [17–20]. Одновременно исследователями отмечается интересный факт: при поступлении с пищей наночастицы селена абсорбируются и используются организмом более эффективно, чем неорганические или органические его соединения [21–23].

Именно поэтому представляет интерес изучение возможного антибактериального действия наночастиц меди и селена по отношению к полиантибиотикорезистентным штаммам бактерий.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение количественных характеристик антибактериального действия наночастиц меди и селена по отношению к полиантибиотикорезистентным штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий.



■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наночастицы меди и селена, применяемые в данной работе, были синтезированы на кафедре теоретической физики и теплотехники УО «Гродненский государственный университет имени Я. Купалы» методом лазерной абляции в жидкости по отработанной методике на установке, схема которой изображена на рис. 1.

В соответствии с рис. 1 излучение твердотельного лазера LS-2147 на основе алюмо-иттриевого граната, легированного ионами неодима (Nd^{3+}), направляется на поворотную призму и далее, отражаясь от зеркала (коэффициент отражения $R \approx 100\%$), фокусируется длиннофокусной линзой в кварцевую кювету с дистиллированной водой, в которой находится медная либо селеновая мишень. В качестве медной мишени использовался куб из цельного металла $1,0 \times 1,0$ см (99,9% чистой меди). Селеновой мишенью являлась таблетка селена элементарного с содержанием чистого селена 99,9%. Степень чистоты изучаемых элементов контролировалась с помощью рентгенофлуоресцентного анализатора ElvaX CEP-01.

Используемое в исследовании лазерное излучение характеризовалось следующими параметрами: энергия генерации в импульсе составляла 100 мДж, длительность лазерного импульса по полувысоте $\tau = 18$ нс, длина волны излучения $\lambda = 1064$ нм. Диаметр сфокусированного лазерного пучка был равен 3,0 мм. Плотность мощности в лазерном пятне при указанной энергии генерации составила для меди $4,2 \times 10^{12}$ Вт/см² и $1,76 \times 10^{11}$ Вт/см² для селена. Лазерная абляция мишени в жидкости (дистиллированная вода) проводилась при частоте следования импульсов 10 Гц в течение 15–20 минут.

Исследование параметров наночастиц изучаемых элементов осуществлялось спектральными методами на спектрофотометре УФ-видимого диапазона Specord 200

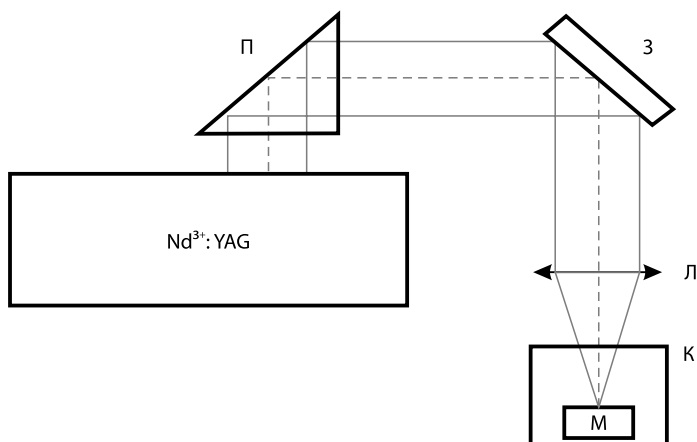


Рис. 1. Схема экспериментальной установки, используемой для получения наночастиц

Примечания: ЛАЗЕР – $\text{Nd}^{3+}:\text{YAG}$ лазер Lotis LS-2147; П – поворотная призма; З – ИК зеркало; Л – фокусирующая линза ($f = 614$ мм); К – кварцевая кювета с жидкостью; М – облучаемая мишень.

Fig. 1. Schematic of the experimental unit used to obtain nanoparticles

(Analytik Jena, Германия). Размерные параметры наночастиц, осажденных из коллоидных растворов, исследовались на сканирующем зондовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь).

На рис. 2 представлены спектры поглощения (a, c) и АСМ-изображения (b, d) полученных наночастиц меди и селена.

Из рис. 2a видно, что спектр поглощения коллоидного раствора имеет три максимума поглощения: два в среднем и ближнем ультрафиолете ($\lambda_1 = 270$ нм и $\lambda_2 = 340$ нм) и третий – широкий – в оранжево-красной ($\Delta\lambda_3 = 580\text{--}800$ нм) области спектра. Оптическая плотность раствора наночастиц меди находится в диапазоне $\sim 0,22\text{--}0,47D$, что соответствует концентрации $\approx 0,345 \times 10^{-4}$ моль/дм³. Цвет раствора – зелено-бирюзовый. Как известно, для наночастиц существует зависимость оптической плотности раствора от размеров наночастиц [24]. При наличии в растворе наиболее мелких изолированных наночастиц спектр поглощения характеризуется узкой и интенсивной полосой поглощения. Увеличение размеров наночастиц сопровождается длинноволновым сдвигом и расширением основной полосы поглощения. Следовательно, большой разброс размеров полученных наночастиц меди обуславливает их широкую полосу поглощения и низкую интенсивность спектра (рис. 2a).

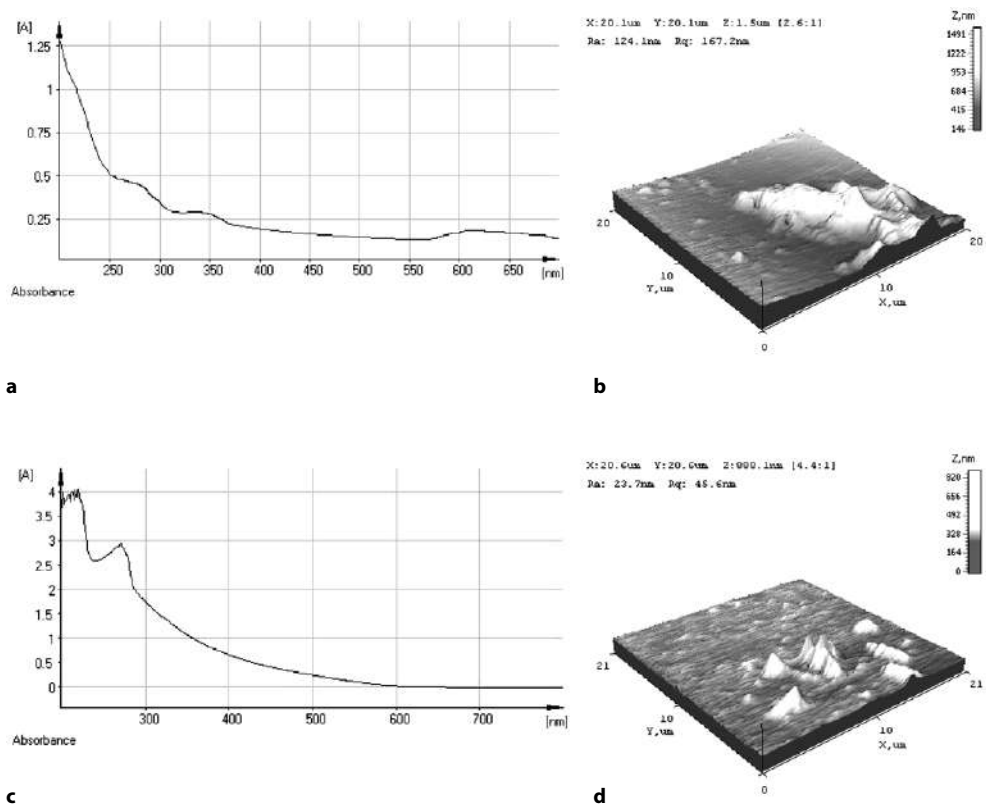


Рис. 2. Спектры поглощения (a, c) и АСМ-изображения (b, d) наночастиц меди и селена
Fig. 2. Absorption spectra (a, c) and AFM images (b, d) of copper and selenium nanoparticles



Наблюдаемая на рис. 2b морфология поверхности наноструктур меди состоит из крупных агрегированных конгломератов, образованных более мелкими структурами. Размеры образовавшихся кристаллитов составляют $\approx 10 \times 4$ мкм по основанию и до 1,5 мкм по высоте. Размеры обособленных наночастиц составляют в среднем $\approx 125\text{--}170$ нм.

На рис. 2b показано, что спектр поглощения коллоидного раствора наночастиц селена имеет максимум в области среднего ультрафиолета ($\lambda = 271$ нм). Оптическая плотность раствора равнялась $\approx 2,95D$, что соответствует концентрации $\approx 2,95 \times 10^{-4}$ моль/дм³. Цвет раствора – морковно-красный.

Анализ АСМ-изображения (рис. 2d) осажденных наночастиц показывает, что наночастицы селена имеют призматическую форму и размеры от 20 до 50 нм в среднем и образуют небольшие скопления. Средние размеры отдельных конгломератов составляют $\approx 1 \times 1,5$ мкм по основанию и высотой до 800 нм.

Согласно литературным данным, эталонные штаммы микроорганизмов хорошо себя зарекомендовали в качестве стандартных контролей при проведении рутинных микробиологических анализов, в межлабораторных сличительных испытаниях, а также на этапах разработки и валидации новых методик исследования микроорганизмов. В то же время данные штаммы бактерий в подавляющем большинстве случаев не обладают выраженной полиантибиотикорезистентностью, географически выделены далеко от территории Республики Беларусь, после их выделения прошли десятилетия, а материал, из которого они выделены, не указан. Именно поэтому с целью максимального приближения полученных результатов к клинической практике в приводимом исследовании было принято решение использовать свежевыделенные патогенные клинические полирезистентные штаммы микробов. Последние были высеяны из гнойных ран хирургических пациентов УЗ «Гродненская университетская клиника» и УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно». В микробиологической лаборатории на анализаторе Vitek 2 Compact фирмы «BioMérieux» осуществлялись идентификация, типирование и определение антибактериальной чувствительности микроорганизмов.

В данном исследовании были использованы клинические патогенные штаммы как грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*), так и грамотрицательных (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*) микроорганизмов. В сериях экспериментов использовали суточные культуры микробов.

Количественные характеристики антибактериального действия наночастиц изучаемых элементов оценивались определением минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций. В качестве метода оценки противомикробных свойств наночастиц меди и селена был применен метод серийных разведений в жидкой питательной среде. Используемый метод осуществлялся в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах с крышкой. Изначально производилось приготовление золя наночастиц меди или селена с максимальной концентрацией, составляющей 2 мг/мл. В первые опытные лунки планшетов объемом 250 мкл каждая помещали 100 мкл золя наночастиц меди (группа «опыт-1») или селена (группа «опыт-2»), 5 мкл взвеси микроорганизмов в концентрации $7,5 \times 10^6$ КОЕ/мл и питательный бульон объемом 95 мкл. Вследствие этого в данной лунке планшета создавалась концентрация наночастиц изучаемого

элемента, равная 1:2 от первоначальной. В последующих опытных лунках формировались двухкратные убывающие разведения наночастиц изучаемых элементов, составляющие соответственно 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128, 1:256 от первоначальной. Мясопептонный бульон Мюллера – Хинтона применялся в качестве жидкой питательной среды. Контроль концентрации микроорганизмов производился на лабораторном денситометре Biosan McFarland DEN-1 по стандарту мутности. В исследовании было решено применять методику положительного и отрицательного контроля. Положительный контроль заключался в наличии контрольной группы, в которой лунки были заполнены мясопептонным бульоном и взвесью микроорганизмов, в данных лунках всегда происходил рост бактерий (контроль-1), в то время как лунки отрицательного контроля заполнялись только стерильным мясопептонным бульоном, в результате чего роста микроорганизмов в них не происходило (контроль-2). После заполнения всех лунок планшета на фотометре производилось определение оптической плотности опытной и контрольных групп при длине волны 540 нм, после чего осуществлялась инкубация в термостате ТС 1/80 СПУ при 37,0 °C в течение 24 часов. По завершении инкубации производилось повторное переопределение оптической плотности опытных и контрольных лунок. Идентичные данные фотометра указывали на отсутствие роста микробов, в то время как фиксируемая прибором мутность была обусловлена бактериальным ростом. Спектрофотометрический метод измерения оптической плотности, описанный выше, выполнялся на фотометре универсальном Ф300, позволяющем работать с 96-луночными плоскодонными планшетами, с обработкой результатов встроенным микроконтроллером. Для получения достоверных результатов опыты проводили в пятикратной повторности с каждой концентрацией наночастиц элементов и исследуемой культурой микроорганизмов.

С целью определения минимальной бактерицидной концентрации после описанного выше суточного культивирования в термостате из опытных лунок планшетов с задержкой роста производился посев на чашки Петри с агаром. Для этого с помощью дозатора и стерильных наконечников отбиралось по 10 мкл суспензии, которая переносилась на чашки Петри, где капля растиралась по поверхности стерильным шпателем. Далее выполнялось повторное инкубирование в термостате при 37,0 °C в течение 24 часов с последующим подсчетом выросших колоний. Концентрация наночастиц меди или селена в лунке планшета, посев из которой не давал роста микрофлоры, соответствовала минимальной бактерицидной концентрации.

Статистическая обработка результатов выполнялась традиционными методами с помощью лицензионных пакетов прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выполненная антибиотикограмма для каждого из изучаемых микроорганизмов была индивидуальна, в связи с чем для оценки антибактериальной резистентности производился расчет процентного соотношения количества антибиотиков, к которым устойчив каждый штамм, и общего количества исследованных антибиотиков в антибиотикограмме. В результате было установлено, что антибиотикорезистентность для *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* составляет 12,5%, *Staphylococcus haemolyticus* – 37,5%, *Pseudomonas aeruginosa* – 46,7%, *Acinetobacter baumannii* – 80,0%, *Proteus mirabilis* – 81,3% и *Klebsiella pneumoniae* – 93,3%. Как видно из пред-



ставленных в работе данных, у использованных бактерий имеются защитные механизмы в форме множественной антибактериальной устойчивости. При этом оба штамма рода *Staphylococcus* являются метициллинрезистентными, то есть представляют серьезную проблему в лечении вызванных ими заболеваний, так как являются устойчивыми ко всем бета-лактамным антибиотикам, включая пенициллины и цефалоспорины. *Staphylococcus haemolyticus* одновременно обладает ванкомицинрезистентными свойствами. Среди представителей группы грамотрицательных микроорганизмов наибольшей антибиотикорезистентностью обладают *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*. Одновременно все изученные грамотрицательные

Таблица 1

Результаты роста микроорганизмов после инкубации в течение 24 часов в термостате при температуре 37,0 °С в различных группах в 96-луночных планшетах

Table 1

Results of microorganisms' growth after incubation for 24 hours in a thermostat at 37.0 °C in different groups in 96-well plates

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Staphylococcus aureus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	н	н	н	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	н	н	н	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Acinetobacter baumannii</i>	опыт-1	н	н	н	н	н	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Escherichia coli</i>	опыт-1	н	н	н	р	р	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	н	н	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	опыт-1	н	н	н	р	р	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	н	н	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Proteus mirabilis</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	р	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	опыт-1	н	н	н	н	р	р	р	р
	опыт-2	н	н	н	н	р	р	р	р
	контроль-1	р	р	р	р	р	р	р	р
	контроль-2	н	н	н	н	н	н	н	н

Примечания: н – в лунке отсутствует рост микроорганизмов; р – в лунке имеется рост микроорганизмов.

бактерии устойчивы к ампициллину, а *Pseudomonas aeruginosa* – и к меропенему. Представленные данные показывают, что использованные в данной работе клинические патогенные штаммы являются полиантибиотикоустойчивыми, а проведенное исследование согласуется с общей тенденцией поиска в мире новых противомикробных препаратов именно по отношению к штаммам, обладающим множественной лекарственной устойчивостью. Одновременно следует подчеркнуть, что антибиотикорезистентность была выражена сильнее у грамотрицательных бактерий.

Данные, характеризующие влияние различных концентраций наночастиц меди и селена на патогенные штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, представлены в табл. 1.

Разница в значениях фотометра для идентичной лунки до и после инкубации говорит о помутнении бульона или о наличии роста микроорганизма в данной питательной среде. Это свидетельствует о недостаточной концентрации наночастиц в данной лунке планшета для достижения ингибирующего воздействия на бактерии. С повышением концентрации наночастиц меди или селена рост микроорганизмов ухудшается. Так, рост *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Acinetobacter baumannii* отсутствовал в лунке планшета при минимальном разведении золя наночастиц меди (1:32), *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis* – при 1:16, а в лунке с *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* – при разведении 1:8.

Минимальная ингибирующая концентрация соответствует концентрации препарата в последней лунке с видимой задержкой роста, имеющей после инкубации прозрачную питательную среду. В то время как минимальная бактерицидная концентрация является наименьшей концентрацией наночастиц, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель 99,9% микроорганизмов от исходного уровня в течение 24 часов.

Результаты изучения минимальной бактерицидной концентрации различных концентраций наночастиц меди и селена представлены в табл. 2.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что из изучаемых микроорганизмов наименьшее разведение наночастиц для проявления бактерицидного эффекта требуется для грамотрицательных микроорганизмов (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas aeruginosa*), в то время как у грамположительных бактерий рода стафилококки (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus*) рост отсутствует при большем разведении наночастиц.

С помощью математической обработки представленных в табл. 1 и 2 данных были определены минимальная ингибирующая и бактерицидная концентрации изучаемых наночастиц. Полученные результаты отражены в табл. 3.

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что значения минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций наночастиц меди и селена различаются в зависимости от используемого штамма микроорганизма. При этом в обеих опытных группах у грамположительных штаммов значения МИК и МБК ниже аналогичных значений. Среднее значение МИК для меди у исследуемых штаммов составило 101,8 мкг/мл, в то время как среднее значение МБК было 321,4 мкг/мл. Для селена среднее значение МИК было 116,1 мкг/мл, а среднее значение МБК – 303,6 мкг/мл. Превышение среднего значения МИК наночастиц меди над аналогичным параметром наночастиц селена при одновременном более низком значении



Таблица 2

Результаты посевов на чашки Петри из лунок опытной группы 24-часовой инкубации в термостате при 37 °С

Table 2

Results of inoculation on Petri dishes from the wells of the experimental group of 24-hour incubation in a thermostat at 37 °C

Штамм микроорганизма	Группа	Пропорции разведения золя							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Staphylococcus aureus	опыт-1	н	н	н	н	р	–	–	–
	опыт-2	н	н	н	н	н	р	–	–
Staphylococcus haemolyticus	опыт-1	н	н	н	н	р	–	–	–
	опыт-2	н	н	н	н	н	р	–	–
Acinetobacter baumannii	опыт-1	н	н	н	р	р	–	–	–
	опыт-2	н	н	р	–	–	–	–	–
Escherichia coli	опыт-1	н	н	р	–	–	–	–	–
	опыт-2	н	н	н	р	р	–	–	–
Klebsiella pneumoniae	опыт-1	н	н	р	–	–	–	–	–
	опыт-2	н	н	н	р	р	–	–	–
Proteus mirabilis	опыт-1	н	н	н	р	–	–	–	–
	опыт-2	н	н	р	–	–	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa	опыт-1	н	н	р	р	–	–	–	–
	опыт-2	н	н	р	р	–	–	–	–

Примечания: н – на чашке отсутствует рост микроорганизмов; р – на чашке имеется рост микроорганизмов.

Таблица 3

Показатели противомикробной активности наночастиц меди и селена по отношению к различным штаммам микроорганизмов

Table 3

Indicators of antimicrobial activity of copper and selenium nanoparticles against various strains of microorganisms

Штамм микроорганизма	Минимальная ингибирующая концентрация наночастиц, мкг/мл		Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц, мкг/мл	
	меди	селена	меди	селена
Staphylococcus aureus	62,50	31,25	125	62,50
Staphylococcus haemolyticus	62,50	31,25	125	62,50
Acinetobacter baumannii	62,50	250	250	500
Escherichia coli	250	62,50	500	250
Klebsiella pneumoniae	250	62,50	500	250
Proteus mirabilis	125	250	250	500
Pseudomonas aeruginosa	125	125	500	500

МБК у наночастиц селена, чем у меди, говорит о разном механизме действия данных наночастиц.

Преимущество применения наночастиц меди в сравнении, к примеру, с наночастицами серебра, золота, палладия или вольфрама заключается в сравнительной дешевизне первых, что автоматически снижает цену на изделия, содержащие данные

наночастицы [25, 26]. В литературе описаны различные методы синтеза наночастиц меди, позволяющие создавать последние различных форм и размеров [27]. Однако следует подчеркнуть, что традиционные физико-химические способы получения наночастиц меди основаны на использовании токсических веществ, которые приводят к наличию у получаемых наночастиц общей токсичности, что делает невозможным использование данных наночастиц в биомедицине [27, 28]. Именно поэтому методы «зеленой» химии, основанные на исключении применения токсических веществ, становятся все более популярными, к ним относится и способ лазерной абляции.

Одним из уникальных физико-химических свойств меди является наличие различных степеней окисления от Cu(0) до Cu(III) [25]. В результате возможно производство трех различных форм наноматериалов на основе меди – Cu, CuO и Cu₂O с антибактериальным действием, сила которого будет зависеть от формы, размера и кристаллической структуры синтезированных наночастиц и метода их изготовления [29, 30].

В то же время точный механизм антибактериального действия наночастиц меди не раскрыт. В литературе предполагают две основные теории его реализации: деполяризация клеточной мембраны и высвобождение реактивных форм кислорода [31, 32]. Считается, что ионы меди, выделяющиеся в присутствии кислорода и воды, образуют комплекс с бактериями и повреждают клеточную стенку. В свою очередь реактивные гидроксильные радикалы, образующиеся в результате циклической окислительно-восстановительной реакции между $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$, по всей видимости, предотвращают размножение бактерий путем повреждения ДНК, липидов и белков [12, 31, 33]. Кроме того, электростатическое взаимодействие облегчает соединение положительно заряженных ионов меди с отрицательно заряженными бактериями [34].

В настоящее время существуют следующие теории антибактериального действия наночастиц селена: (1) отрицательное воздействие на аденозинтрифосфат (АТФ), (2) повышение внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК), (3) деполяризация бактериальной мембраны и (4) ее разрушение [35–39]. К примеру, активные формы кислорода могут повреждать ДНК, клеточные мембраны и клеточные белки вплоть до гибели клеток; индуцировать увеличение концентрации цитозольного кальция; приводить к транслокации факторов транскрипции и запускать защитный механизм, который останавливает процесс клеточного деления до тех пор, пока ДНК не будет восстановлена [40]. При этом точный механизм действия не установлен, однако очевидно, что он реализуется разными путями. Именно поэтому у патогенных бактерий развитие устойчивости к воздействию наночастиц считается крайне маловероятным.

Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из слоя пептидогликана, через который легко проникают наночастицы, в то время как у грамотрицательных микробов имеются две мембраны, защищенные экспрессией липополисахарида на поверхности клетки, что обеспечивает дополнительную защиту. Данным фактом можно объяснить наблюдаемую в исследовании большую чувствительность грамположительных микробов к наночастицам в сравнении с грамотрицательными.

Таким образом, в данном исследовании было показано, что экологически безопасный метод лазерной абляции в жидкости позволяет осуществлять синтез наночастиц меди и селена, обладающих выраженным антибактериальным действием



по отношению к клиническим патогенным штаммам грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. В сравнении с имеющимися публикациями, где используют стандартные штаммы микробов, в настоящем исследовании впервые использованы непосредственно свежевыделенные актуальные штаммы полиантибиотикорезистентных форм бактерий, что указывает на возможность дальнейшего более глубокого изучения применения данных наночастиц в клинической практике.

■ ВЫВОДЫ

1. Метод лазерной абляции в жидкости является эффективным методом для получения относительно однородных по форме и размерам наночастиц как металлов, так и неметаллов.
2. Методика получения наночастиц данным способом не требует применения экологически опасных и токсичных для человека веществ, что относит ее к «зеленой» химии и гарантирует отсутствие токсического воздействия примесей у синтезируемых наночастиц.
3. Наночастицы меди и селена обладают выраженными антибактериальными свойствами по отношению к клиническим грамположительным и грамотрицательным штаммам патогенных микроорганизмов, обладающим полиантибиотикорезистентностью.
4. В сравнении с традиционно применяемыми антибиотиками, наночастицы меди и селена имеют такие преимущества, как множественный механизм действия на бактерию, более простые способы синтеза и более высокая стабильность.
5. Превышение среднего значения МИК наночастиц меди над аналогичным параметром наночастиц селена при одновременном более низком значении МБК у наночастиц селена, чем у меди, говорит о разном механизме действия данных наночастиц.
6. Установленные значения ингибирующей и бактерицидных концентраций наночастиц следует учитывать при внедрении изделий на их основе в клиническую практику.
7. Механизм действия наночастиц меди и селена окончательно не изучен, его полное установление, возможно, раскроет дополнительные способы применения данных наночастиц.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Jindal A.K., Pandya K., Khan I.D. Antimicrobial resistance: a public health challenge. *Med J Armed Forces India*. 2015;71(2):178–181. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.04.011
2. Kirby A., Santoni N. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: what impact on the efficacy of antibiotic prophylaxis in colorectal surgery? *J. Hosp. Infect.* 2015;89(4):259–263. doi: 10.1016/j.jhin.2014.11.016
3. Ahmad M., Khan A.U. Global economic impact of antibiotic resistance: a review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:313–316. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.024
4. Dovnar R.I. Economic losses of the health care of the Republic of Belarus due to the presence of antibacterial resistance of microorganisms. *Information resource management*. Minsk: Academy of Public Administration under the aegis of the President of the Republic of Belarus. 2021;262–263. (in Russian)
5. Shestakov S.V. How does horizontal gene transfer occur and what limits it in bacteria. *Ecological genetics*. 2007;5(2):12–24. (in Russian)
6. Vaidya V.K. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum β lactamase-producing enterobacteriaceae. *J Lab Physicians*. 2011;3(1):37–42. doi: 10.4103/0974-2727.78563
7. Sharma P. Role and significance of biofilm-forming microbes in phytoremediation – a review. *Environmental technology & innovation*. 2022;25:102182. doi: 10.1016/j.eti.2021.102182

8. Gilavand F., Marzban A., Ebrahimipour G. Designation of chitosan nano-vaccine based on MxiH antigen of *Shigella flexneri* with increased immunization capacity. *Carbohydr Polym.* 2020;232(15):115813. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115813
9. Vasilkov A.Yu., Dohnar R.L., Smotryn S.M. Plasmon resonance of silver nanoparticles as a method of increasing their antibacterial action. *Antibiotics.* 2018;7(3):80. doi: 10.3390/antibiotics7030080
10. Gatadi S., Madhavi Y.V., Nanduri S. Nanoparticle drug conjugates treating microbial and viral infections: a review. *Journal of molecular structure.* 2021;1228:129750. doi: 10.1016/j.molstruc.2020.129750
11. Momeni S., Sedaghati F. CuO/Cu₂O nanoparticles: a simple and green synthesis, characterization and their electrocatalytic performance toward formaldehyde oxidation. *Microchemical Journal.* 2018;143:64–71. doi: 10.1016/j.microc.2018.07.035
12. Abiraman T., Balasubramanian S. Synthesis and characterization of large-scale (<2 nm) chitosan-decorated copper nanoparticles and their application in antifouling coating. *Industrial & engineering chemistry research.* 2017;56(6):1498–1508. doi: 10.1021/acs.iecr.6b04692
13. Underwood E.J. *Trace elements in human and animal nutrition. 4th edition.* Amsterdam: Elsevier; 1977; 560 p. doi: 10.1016/B978-0-12-709065-8.X5001-9
14. Mahmoodi S.R., Bayati M., Rad S.H. Dielectrophoretic trapping of selenium nanorods for use in device applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 2013;24(11):4554–4559. doi: 10.1007/s10854-013-1441-6
15. Kumar N., Kumar S. Microstructural, optical and electrical investigations of large scale selenium nanowires prepared by template electrodeposition. *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* 2014;25(8):3537–3542. doi: 10.1007/s10854-014-2052-6
16. Barnaby S.N., Frayne S.H., Fath K.R. Growth of Se nanoparticles on kinetin assemblies and their biocompatibility studies. *Soft Mater.* 2011;9(4):313–334. doi: 10.1080/1539445X.2010.516302
17. Zeng H., Combs G.F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.* 2008;19(1):1–7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.02.005
18. Lee K.H., Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol. Med. Rep.* 2012;5(2):299–304. doi: 10.3892/mmr.2011.651
19. Zhai X., Zhang C., Zhao G. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J. Nanobiotechnol.* 2017;15(1):4. doi: 10.1186/s12951-016-0243-4
20. Kora A.J. Tree gum stabilised selenium nanoparticles: characterisation and antioxidant activity. *IET Nanobiotechnol.* 2018;12(5):658–662. doi: 10.1186/s12951-016-0243-4
21. Benko I., Nagy G., Tanczos B. Subacute toxicity of nano-selenium compared to other selenium species in mice. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012;31(12):2812–2820. doi: 10.1002/etc.1995
22. Hu C.H., Li Y.L., Xiong L. Comparative effects of nano elemental selenium and sodium selenite on selenium retention in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012;177(3–4):204–210. doi: 10.1016/j.anifeeds.2012.08.010
23. Shi L., Xun W., Yue W. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nanoelemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Ruminant Res.* 2011;96(1):49–52. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.005
24. Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(4):1115–1122. doi: 10.1007/s00253-009-2159-5
25. Gawande M.B., Goswami A., Felpin F.X. Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. *Chem. Rev.* 2016;116(6):3722–3811. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00482
26. Verma N., Kumar N. Synthesis and biomedical applications of copper oxide nanoparticles: an expanding horizon. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019;5(3):1170–1188. doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01092
27. Kumar A., Saxena A., De A. Facile synthesis of size-tunable copper and copper oxide nanoparticles using reverse microemulsions. *RSC Advances.* 2013;3:15. doi: 10.1039/C3RA23455J
28. Bhanushali S., Ghosh P.C., Ganesh A. 1D copper nanostructures: progress, challenges and opportunities. *Small.* 2015;11(11):1232–1252. doi: 10.1002/sml.201402295
29. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346–2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059
30. Pan Y., Xia Q., Xiao H. Cationic polymers with tailored structures for rendering polysaccharide-based materials antimicrobial: an overview. *Polymers (Basel).* 2019;11(8):1283. doi: 10.3390/polym11081283
31. Raghavendra G.M., Kim J.J., Seo J. Chitosan-mediated synthesis of flowery-Cu₂O, and its antibacterial and catalytic properties. *Carbohydrate polymers.* 2017;172(15):78–84. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.070
32. Simões D., Miguel S.P., Ribeiro M.P. Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;127:130–141. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.022
33. Angelé-Martínez C., Nguyen K.V., Ameer F.S. Reactive oxygen species generation by copper(II) oxide nanoparticles determined by DNA damage assays and EPR spectroscopy. *Nanotoxicology.* 2017;11(2):278–288. doi: 10.1080/17435390.2017.1293750
34. Li K., Jin S., Chen H. Bioinspired interface engineering of gelatin/cellulose nanofibrils nanocomposites with high mechanical performance and antibacterial properties for active packaging. *Composites part B: Engineering.* 2019;171:222–234. doi: 10.1016/j.compositesb.2019.04.043
35. Mempo R., Tran H., Chen C. Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC Microbiol.* 2013;13:301. doi: 10.1186/1471-2180-13-301
36. Li Y., Zhang W., Niu J. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. *ACS Nano.* 2012;6(6):5164–5173. doi: 10.1021/nn300934k
37. Lok C.-N., Ho C.-M., Chen R. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.* 2006;5(4):916–924. doi: 10.1021/pr0504079
38. Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* 2017;12:1227–1249. doi: 10.2147/ijn.s121956
39. Tong G., Du F., Wu W. Enhanced reactive oxygen species (ROS) yields and antibacterial activity of spongy ZnO/ZnFe₂O₄ hybrid micro-hexahedra selectively synthesized through a versatile glucose-engineered co-precipitation/annealing process. *J. Mater. Chem. B.* 2013;1(20):2647–2657. doi: 10.1039/C3TB20229A
40. Castranova V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radicals Biol. Med.* 2004;37(7):916–925. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.032