



УДК 579.61/546.55/59

ВЛИЯНИЕ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА СТАНДАРТНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

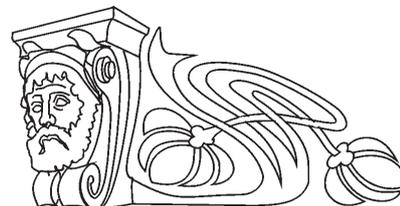
Т. А. Шульгина¹, О. В. Нечаева^{2,3}, А. С. Торгашова²,
Н. В. Беспалова³, Е. В. Глинская⁴, Н. Ф. Шуршалова⁴

¹НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии Саратовского государственного медицинского университета имени В. И. Разумовского

²Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

³Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.

⁴Саратовский государственный национальный исследовательский университет имени Н. Г. Чернышевского



Начальным этапом взаимодействия возбудителей инфекционных заболеваний с клетками макроорганизма является процесс адгезии. Поэтому существует необходимость разработки методов, способствующих снижению адгезивной активности микроорганизмов. Цель работы: изучить влияния водной и водной диализованной дисперсии наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *S. aureus*. С использованием стандартной методики для клеток *S. aureus* определены средний показатель адгезии, коэффициент адгезии, на основании которых рассчитан индекс адгезии микроорганизмов. Установлено, что воздействие на клетки стандартного и клинических штаммов *S. aureus* сублетальных концентраций (0,25) водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди способствовало снижению показателей индекса адгезии микроорганизмов в 1,8–2,48 раза по сравнению с контролем до неадгезивного уровня и не зависело от типа используемых металлических наночастиц. Водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов могут быть использованы в качестве активных компонентов антисептических и дезинфицирующих средств.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, адгезия, водные дисперсии наночастиц серебра и меди.

The Influence of Aqueous Dispersions of Metal Nanoparticles on the Adhesive Properties of the Standard and Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*

T. A. Shulgina, O. V. Nechaeva, A. S. Torgashova,
N. V. Bepalova, E. V. Glinskaya, N. F. Shurshalova

The initial stage of interaction of infectious agents with micro-organisms cells is the process of adhesion. So there is a need to develop methods that reduce the adhesive activity of microorganisms. Aim: to study the impact of water and water dialyzed dispersion of silver and copper nanoparticles obtained by biochemical synthesis, on the adhesive properties of the standard and clinical strains of *S. aureus*. Using standard techniques for cells of *S. aureus* determined the average index of adhesion, coefficient of adhesion, based on which the index is calculated adhesion of microorganisms. It is proved that the effect on the cells of standard and clinical strains of *S. aureus* with sub-lethal concentrations (0,25%) water and water dialyzed dispersions of silver and copper nanoparticles contributed to the lowering of the index

of microorganisms adhesion in a 1.8–2.48 times compared with the control non-adhesive up to the level and did not depend on the type of used metal nanoparticles. Water and water dialyzed dispersion of metal nanoparticles can be used as active ingredients of antiseptic and disinfectants.

Key words: *Staphylococcus aureus*, adhesion, aqueous solutions, nanoparticles, silver, copper.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-184-188

Условно-патогенные бактерии рода *Staphylococcus* являются одними из основных возбудителей гнойно-септических заболеваний различной локализации [1, 2]. В процессе эволюции они выработали множество адаптивных механизмов, обеспечивающих эффективное взаимодействие с мишенями макроорганизма. Одним из них является адгезия на чувствительных клетках, которая определяется межклеточными взаимодействиями различной природы и является определяющим фактором вирулентности, поскольку представляет собой пусковой механизм в развитии инфекционного процесса [3–7].

В качестве основных факторов адгезии *S. aureus* выступают тейхоевые кислоты, которые обеспечивают прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам, а также капсульные полисахариды и белок А [8, 9]. Благодаря адгезинам осуществляются процессы, как неспецифической, так и специфической адгезии, в результате чего происходит трансформация поверхностных структур клетки-хозяина, что облегчает леганд-рецепторное взаимодействие с ней бактерий [10, 11]. Стафилококки способны к формированию микробных биопленок как в организме, так и на абиотических поверхностях госпитальной среды и на изделиях медицинского назначения [12, 13]. Поэтому разработка мероприятий, направленных на снижение адгезивной активности микробных клеток, является актуальной.



Целью данной работы явилось изучение влияния водной и водной диализованной дисперсии наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, на адгезивные свойства стандартного и клинических штаммов *S. aureus*.

Материалы и методы

В качестве экспериментальной модели использовали стандартный штамм *S. aureus* 209Р, полученный из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В. И. Разумовского, а также четыре клинических штамма – *S. aureus* 84, *S. aureus* 97, *S. aureus* 273 и *S. aureus* 275, выделенные от больных травматолого-ортопедического профиля.

В исследованиях использовали водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов, предоставленные ООО НПК «Наномет» (Москва), полученные путем биохимического синтеза [14], в котором сочетаются преимущества системы обратных мицелл и биологических восстановителей. Использование данного метода позволяет получать стабильные в растворе в течение длительного времени наночастицы металлов, а применение природных восстановителей делает синтез более экологически безопасным. Характеристика водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди согласно паспорту представлена в таблице.

Характеристика опытных образцов

Название соединения	Лабораторный шифр	Содержание, мМ
Водный раствор наночастиц серебра	AgW	$C_{Ag} = 3,9$ $C_{AOT} = 37$
Водный диализованный раствор серебра	AgWD	$C_{Ag} = 4,3$ $C_{AOT} = 5$
Водный раствор наночастиц меди	CuW	$C_{Cu} = 0,25$ $C_{AOT} = 60$
Водный диализованный раствор меди	CuWD	$C_{Cu} = 0,25$ $C_{AOT} = 23$
Раствор стабилизатора – диоктилсульфосукцинат натрия	AOT	$C_{AOT} = 30$

Адгезивную способность бактериальных клеток определяли при помощи методов В. И. Брилис с соавт. [15] и С. С. Гизатулиной с соавт. [16]. Для этого использовали суспензию исследуемых бактерий в концентрации 10^9 м.к./мл в 0,9%-ном растворе хлорида натрия (рН 7,2) и суспензию эритроцитов человека 0(I) Rh+ группы крови в концентрации 10^8 кл/мл. В пробирках смешивали по 0,5 мл суспензий микробных клеток и эритроцитов. Полученную смесь инкубировали при встряхивании на шейкере при температуре 37°C в течение 30 минут, после чего на предметных стеклах готовили мазки, фиксацию которых проводили смесью Никифорова. Полученные препараты окрашивали по Граму и исследовали в иммерсионной системе микроскопа. Опытные образцы микробных клеток обрабатывали субингибирующими концентрациями водных дисперсий наночастиц металлов (0,25%), которые были определены экспериментальным путем [17].

Оценку влияния металлических наночастиц в составе водных дисперсий на адгезивную активность микроорганизмов определяли по трем основным показателям:

– средний показатель адгезии (СПА) – среднее число микроорганизмов, прикрепившихся к

поверхности одного эритроцита, при подсчете не менее 25 эритроцитов;

– коэффициент адгезии (КА) – процент эритроцитов из числа учитываемых, имеющих на своей поверхности микроорганизмы;

– индекс адгезии микроорганизма (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе. Расчет ИАМ проводили по формуле

$$ИАМ = \frac{СПА}{КА} \times 100\% \quad (1)$$

В зависимости от ИАМ все микроорганизмы можно разделить на 4 группы:

- неадгезивные, если ИАМ от 1,00 до 1,75;
- низкоадгезивные – от 1,76 до 2,49;
- среднеадгезивные – от 2,50 до 3,99;
- высокоадгезивные – $> 4,00$.

Все результаты обработаны методами вариационной статистики с определением средних арифметических величин (M) и средней ошибки средней арифметической (m) по формуле Петерса с использованием константы Молденгауэра (k) [18]:

$$m = \pm \sum a \times k, \quad (2)$$

где a – отклонение вариантов от средней арифметической, k – константа Молденгауэра.



Определяли доверительные интервалы (I) и сравнивали средние данные с помощью критерия Стьюдента (t) при уровне статистической значимости различий (P) не более 0,05. При применении данного метода варьирование показателей в каждом ряду не оказывает значительного влияния на конечные результаты и тем самым достигается независимость показателей от индивидуальных различий.

Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows; «Stat Soft Inc.», США), Statgraph (Version 2.6; Coulter), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP). Статистические результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$.

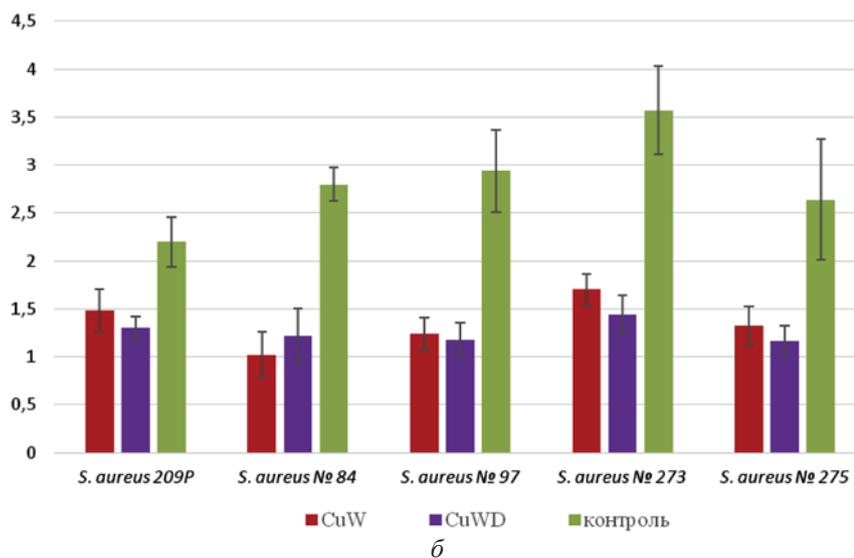
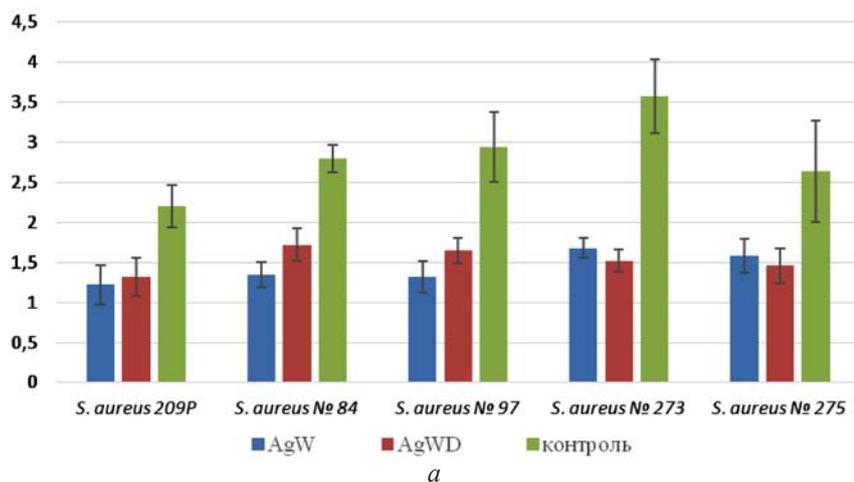
Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований было установлено, что стандартный штамм *S. aureus*

209 P по показателям ИАМ характеризовался как низкоадгезивный ($2,2 \pm 0,26$), а клинические штаммы *S. aureus* № 84, № 97, № 273, № 275 – как среднеадгезивные, поскольку значения ИАМ составляли $2,8 \pm 0,17$; $2,94 \pm 0,43$; $3,57 \pm 0,46$ и $2,64 \pm 0,63$ соответственно.

После обработки клеток микроорганизмов субингибирующими концентрациями водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди также было выявлено достоверное значительное снижение адгезивной активности всех исследуемых бактерий по сравнению с контролем вне зависимости от вида используемых наноструктур, поскольку по показателям ИАМ стандартный и все клинические штаммы *S. aureus* характеризовались как неадгезивные (рисунок).

Было установлено, что наиболее выраженное изменение адгезивной активности стан-



Значения индекса адгезии микроорганизмов стандартного и клинических штаммов *S. aureus* при действии дисперсий наночастиц металлов: a – водной и водной диализованной дисперсии наночастиц серебра; b – водной и водной диализованной дисперсии наночастиц меди



дартного штамма *S. aureus* 209 P вызывала водная дисперсия наночастиц серебра, что способствовало достоверному снижению ИАМ в 1,8 раза по сравнению с контрольными значениями.

В отношении клинических штаммов *S. aureus* наибольшей эффективностью в снижении адгезивных свойств характеризовались водные дисперсии наночастиц меди. Так, обработка клеток клинического штамма *S. aureus* № 84 водной дисперсией наночастиц меди приводило к уменьшению ИАМ в 2,75 раза по сравнению с контролем, а клеток клинического штамма *S. aureus* № 97 – в 2,37 раза. Для клинических штаммов *S. aureus* № 273 и *S. aureus* № 275 наиболее значимое снижение адгезивной активности происходило при обработке клеток водной диализованной дисперсией наночастиц меди и уменьшение ИАМ в 2,48 и 2,28 раза соответственно по сравнению с контролем.

Согласно литературным данным механизм действия наночастиц металлов на микробную клетку заключается в их адсорбции на клеточной стенке, которая выполняет защитную функцию [19, 20]. На начальных этапах взаимодействия микробная клетка сохраняет свою жизнеспособность, но при этом нарушаются некоторые ее функции, в частности процесс бинарного деления, чем и достигается бактериостатический эффект. Для реализации бактерицидного эффекта наночастицы металлов проникают внутрь клетки и ингибируют ферменты дыхательной цепи, а также разобщают процессы дыхания и окислительного фосфорилирования, в результате чего клетка гибнет.

Снижение адгезивной активности стандартных и клинических штаммов *S. aureus*, вероятно, связано с блокировкой наночастицами серебра и меди поверхностных структур микробных клеток и гемолизина, для которого рецептором является фибронектин эритроцитов [21, 22]. Однако данное предположение требует более детального изучения.

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать возможности использования препаратов, содержащих металлические наноструктуры, для местного лечения и профилактики заболеваний, вызванных чувствительными микроорганизмами, а также как высокоэффективные компоненты антисептических и дезинфекционных средств для обработки поверхностей с целью преодоления формирования на них микробных биопленок.

Список литературы

1. Fry D. E., Barie P. S. The Changing Face of *Staphylococcus aureus*: A Continuing Surgical Challenge // *Surgical Infections*. 2011. Vol. 12, № 3. P. 191–203.
2. May A. K. Skin and Soft Tissue Infections: The New Surgical Infection Society Guidelines // *Surgical Infections*. 2011. Vol. 12, № 3. P. 179–184.
3. Благодирова А. С., Афонин А. Н., Воробьева О. Н., Широкова И. Ю. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений // *Мед. альманах*. 2011. № 5 (18). С. 215–218.
4. Карташова О. Л., Норкина А. С., Чайникова И. Н., Смолягин А. И. Фенотипическая характеристика стафилококков и местный иммунитет при бактерионосительстве // *Журн. микробиол.* 2009. № 4. С. 99–103.
5. Сэндел Т. Механизмы бактериальной адгезии // *Чистые помещения и технологические среды*. 2014. № 1 (49). С. 54–58.
6. Edwards A. M., Potter U., Meenan N.A.G., Potts J. R., Massey R. C. *Staphylococcus aureus* Keratinocyte Invasion Is Dependent upon Multiple High-Affinity Fibronectin-Binding Repeats within FnBPA // *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 4. e18899.
7. Foster T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion // *Veterinary Dermatology*. 2009. Vol. 20. P. 456–470.
8. Зубарева И. В. Адгезия стафилококка и кишечной палочки к различным клеткам человека // *Иммунопатология. Аллергология. Инфектология*. 2003. № 4. С. 85–93.
9. Фалова О. Е. Взаимосвязь и степень выраженности адгезивной способности и антилизационной активности стафилококков, выделенных с кожи людей, страдающих хроническими дерматозами // *Вестн. Том. гос. ун-та*. 2011. № 349. С. 188–189.
10. Бухарин О. В., Усвятцов Б. Я., Карташова О. Л. Биология патогенных кокков. М.: Медицина; Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2002. 278 с.
11. Дерябин Д. Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. 138 с.
12. Маянский А. Н., Чеботарь И. В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение // *Журн. микробиол.* 2011. № 1. С. 101–108.
13. Ульянов В. Ю., Определенцева С. В., Заярский Д. А., Нечаева О. В., Вакарева М. М., Тихомирова Е. И. Биологическая кинетика пленкообразования эталонными и клиническими штаммами *Staphylococcus aureus* // *Sworld*: сб. науч. тр. 2014. Т. 35, № 1. С. 40–42.
14. Пат. 2147487 РФ. Способ получения наноструктурных металлических частиц / Е. М. Егорова, А. А. Ревина, В. С. Кондратьева; № 99114319/02; заявл. 01.07.99; опубл. 20.04.2000. Бюл. № 11.



15. Брилис В. И., Брилене Т. А., Ленцнер Х. П., Ленцнер А. А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210–212.
16. Гизатулина С. С., Биргер М. О., Кулинич Л. И., Фиш Н. Г. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных колоний и типу адгезинов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 1991. № 4. С. 21–23.
17. Шульгина Т. А., Нечаева О. В. Анализ эффективности действия нанолекарств в составе водных растворов на биологическую активность грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов // Вестн. Костром. гос. ун-та им. Н. А. Некрасова. 2014. № 4. С. 31–36.
18. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Изд-во мед. лит., 1986. 184 с.
19. Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour // Toxicol. and Appl. Pharmacol. 2012. № 258. P. 151–165.
20. Soni I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study of E. coli as a model for gram-negative bacteria // J. Colloid Interface Sci. 2004. № 275. P. 177–182.
21. Усвятцов Б. Я., Ханина Е. А., Бухарин О. В. Взаимодействие бактерий и эритроцитов // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005. № 4. С. 89–95
22. Серегина Н. В., Честнова Т. В., Жеребцова В. А., Хромушкин В. А. Обзор биофизических особенностей микробной // Вестн. новых мед. технологий. 2008. Т. XV, № 3. С. 175–177.

Образец для цитирования:

Шульгина Т. А., Нечаева О. В., Торгашова А. С., Беспалова Н. В., Глинская Е. В., Шуршалова Н. Ф. Влияние водных дисперсий наночастиц металлов на адгезивные свойства стандартных и клинических штаммов *Staphylococcus aureus* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 184–188. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-184-188.

Cite this article as:

Shulgina T. A., Nechaeva O. V., Torgashova A. S., Bepalova N. V., Glinskaya E. V., Shurshalova N. F. The Influence of Aqueous Dispersions of Metal Nanoparticles on the Adhesive Properties of the Standard and Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 184–188 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-2-184-188.
