

Оценка эффективности антимикробного действия низкоинтенсивного лазерного излучения, наночастиц меди и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*

В.В. АЛИПОВ, Е.А. ДОБРЕЙКИН, А.И. УРУСОВА, П.А. БЕЛЯЕВ

Саратовский государственный медицинский университет им.В.И.Разумовского, Саратов, Российская Федерация

Актуальность Для экспериментального обоснования эффективности применения лазерных нанотехнологий актуальным является изучение бактерицидных свойств наночастиц и антимикробной активности лазерного излучения.

Цель исследования Изучить выраженность антимикробного действия наночастиц меди, низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы Выраженность антимикробного действия синтезированных наночастиц меди и лазерного излучения в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* оценивали по оптическому стандарту мутности Мак-Фарланда 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 и их обсуждение 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, наночастицы меди, сочетанное применение

Evaluation of Antimicrobial Effect of Copper Nanoparticles' and Low-intensity Laser Radiation and Their Combined Application *in vitro* Experiment

V.V. ALIPOV, E.A. DOBREIKIN, A.I. URUSOVA, P.A. BELIAEV

Saratov State Medical University named after V.I.Razumovskii, Saratov, Russian Federation

Relevance The study of nanoparticles' bactericidal properties and laser radiation antimicrobial activity is quite relevant for experimental substantiation of laser nanotechnologies' application efficiency.

The purpose of the study 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 *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 and their discussion 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 *in vivo* conditions.

Key words Antimicrobial activity, low-intensity laser radiation, copper nanoparticles, combined application.

Лазерная медицина, как прогрессивное направление медицинской науки, наиболее точно оценила значение наночастиц для экспериментальных исследований *in vitro*. Антиинфекционные механизмы действия НИЛИ отмечены во многих исследованиях. Так, использование низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) позволяет обеспечить выраженное иммунокорректирующее и антимикробное воздействие, стимулирует регенераторные процессы и улучшает микроциркуляцию [3, 11]. Подобные результаты применения НИЛИ получены и Э.А.Гаджиевым и В.И.Елисеенко (2009), по данным которых применение

НИЛИ стимулирует макрофагальную реакцию, активирует биосинтетическую функцию фибробластов, оптимизирует процессы ангио- и фибриллогенеза [4].

За последнее пятилетие в работах иностранных и отечественных ученых установлено, что наночастицы меди, серебра и других металлов проявляют ярко выраженную биологическую активность, в том числе бактериостатическое и бактерицидное действие, причем это действие пролонгировано и менее токсично по сравнению с солями меди [5]. В литературе имеются единичные сообщения о применении наночастиц в экспериментальной хирургии [1]. В работе

И.И.Бабушкиной и соавт. (2010), сообщается, что при исследовании *in vitro* наночастицы меди и железа обладают выраженным антибактериальным действием на клинические штаммы золотистого стафилококка [2, 8]. 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 [9, 10].

Имеются единичные исследования о сочетанном применении лазерных и нанотехнологий. Лазерные методы могут применяться для управления внутриканальным транспортом биофункциональных наночастиц, при этом изменяет гидропроницаемость ткани в 20 раз за счет образования каналов и пор [6]. Как показано А.И. Омельченко (2008), введение магнитных наночастиц вызывает неразрушающее лазерное воздействие, ускоряет их проникновение в ткани [7]. Однако работ, оценивающих сочетанную антиинфекционную активность НИЛИ и наночастиц металлов в экспериментах исследованиях до настоящего времени не проводилось.

Цель – изучить выраженность антимикробного действия наночастиц меди, лазерного излучения и их сочетанного применения в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы

Получение наночастиц меди. 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 аппарата 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.

Проведены 204 исследования, которые позволили оценить возможности антиинфекционной активности сочетанного применения НИЛИ и нанотехнологий. Выраженность антимикробного действия синтезированных наночастиц меди и НИЛИ в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* оцени-

вали 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 (рис. 1, 2).

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 высев (по 0,1 мл) на чашки с мясо-пептонным агаром и через 24 часа инкубации при 37°C в условиях перемешивания (50 оборотов в минуту) подсчитывали количество выросших колоний (рис. 3, 4).

При проведении статистической обработки руководствовались методикой определения среднего ква-



Рис. 1, 2. Воздействие на культуру микроорганизмов аппаратом АЛТ «Матрикс», тип МЛЮ1КР.

драгичного отклонения найденных в опыте значений, предложенной И.П. Ашмариним и А.А. Воробьевым.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что на первом этапе исследования полученные количества выросших колоний сразу после посева существенно не отличались от контроля (табл. 1).

Эксперимент 1-й серии. Через 1 и 2 часа культивирования после лазерного облучения отмечалось снижение количества колоний опытного штамма до $99 \pm 2,3$ и $1212 \pm 4,2$ ($p < 0,05$), соответственно, однако, на третьем часе рост *Staphylococcus aureus* возобновлялся.

Таким образом, эффективность действия лазера констатируется только в течение одного часа. Антибактериальные свойства изолированного НИЛИ признаны недостаточно эффективными.

Эксперимент 2-й серии. Через 24 часа инкубации при 37°C высеянных на чашки Петри микроорганизмов, предварительно культивированных 1 час в присутствии ультрадисперсного порошка меди, отмечалось достоверное снижение количества колоний до 423 ± 60 , 1540 ± 325 и 2446 ± 530 , соответственно, по сравнению с контролем, где отмечался рост в виде газона (сплошной рост) (рис. 5, 6). Подобная тенденция сохранялась через 2 и 3 часа культивирования. Нано-

порошок 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 (табл. 2).

Третья серия экспериментов. Сочетание лазерного облучения с опытными концентрациями нанопорошков 1мг, 100 и 10 мкг/мл через 1 час культивирования привело к еще большему снижению количества клеток до 34 ± 10 , 125 ± 24 и 2267 ± 149 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.

Таким образом, выявлен синергизм антимикробного действия сочетанного использования наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного излучения при воздействии на культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Заключение

Подводя итог проведенным исследованиям можно констатировать, что имеется определенный 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 о том, 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 НИЛИ при воздействии на культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, что позволяет получать антибактериальный эффект при более низких (менее 10 мкг/мл) концентрациях наночастиц меди, снижая тем самым возможное токсическое

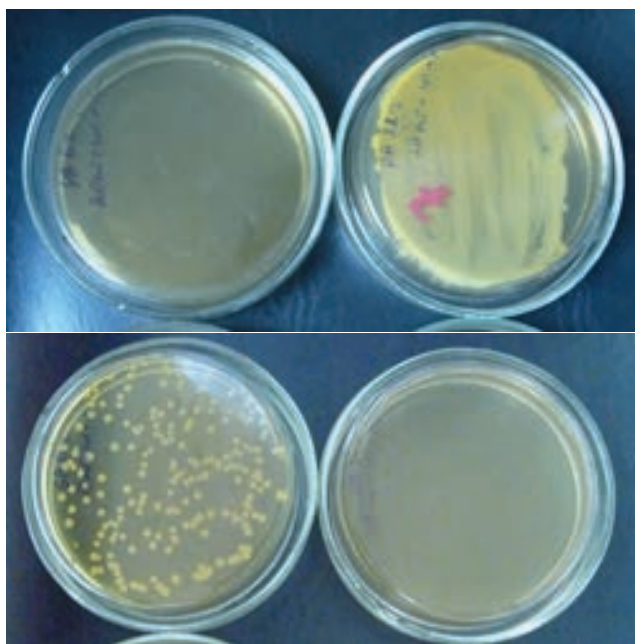


Рис. 3, 4. Колонии *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* через 24 часа культивирования.

Таблица 1

Количество колоний штамма *S. aureus* в зависимости от времени посева и условий культивирования (M±m)

Серия эксперимента	Условия культивирования	Время посева, ч			
		0	1	2	3
	Контроль	$3153 \pm 5,2$	газон	газон	газон
I	Лазерное облучение	$3086 \pm 2,0^*$	$99 \pm 2,3^*$	$1212 \pm 4,2^*$	$5416 \pm 8,2$

Примечание: * - статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$)

Таблица 2

Суммарное количество колоний *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* согласно времени инкубации до мерного высева

Условия культивирования		Количество колоний согласно времени высева			
		0 ч	1 ч	2 ч	3 ч
К		3255±26	газон	газон	газон
наномедь	1000 мкг	3109±38	423±60*	25±12*	0
	100 мкг	3145±41	1540±325*	92±14*	0
	10 мкг	3236±25	2446±530*	780±95*	0
	1 мкг	3230±20	газон	газон	газон
наномедь+ лазер	1000 мкг и облучение	3156±27	34±10**	0	0
	100 мкг и облучение	3247±35	125±24**	0	0
	10 мкг и облучение	3228±24	2267±149**	456±63**	0
	1 мкг и облучение	3394±39	2187±149	836±50*	350±23

Примечание: К – контроль (физиологический раствор хлорида натрия);

* - статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$);

** - статистически значимые отличия от серии «наномедь» ($p < 0.05$).

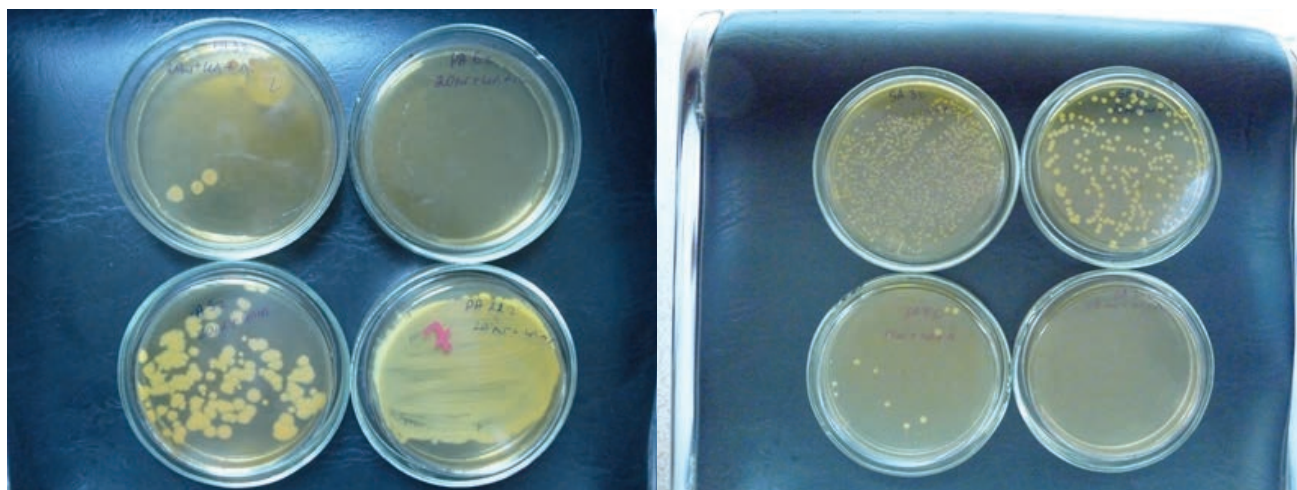


Рис. 5, 6. Влияние различных концентраций наночастиц меди и лазерного облучения на рост колоний микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

действие данного вещества на организм в условиях *in vivo*.

Работа поддержана грантом инновационно-инвестиционного Фонда Самарской области. Тема «Экс-

периментальное обоснование сочетанного применения наночастиц меди и низкоинтенсивного лазерного облучения для лечения ожоговых ран» № государственной регистрации 01201153381. Самара, 2011.

Список литературы

1. Алипов В.В., Лебедев М.С., Цацаев Х.М., Алипов Н.В., Добрейкин Е.А., Урусова А.И. Экспериментальные лазерные нанохирургические технологии. Первые результаты и перспективы. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2011; 4: 2; 330-333.
2. Бабушкина И.В., Бородулин Б.В., Коришунов Г.В. Пучиньян В.М. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus*. Саратовский научно-медицинский журнал. 2010; 1: 11-14.
3. Бриль Г.Е., Петросян В.И., Житнева Э.А. Новые данные об изменении структуры биожидкостей под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения. Физическая медицина 1996; 1-2: 39-40
4. Гаджиев Э.А., Елисеенко В.И. Морфологические особенности заживления гнойной раны при традиционном способе лечения и потенцировании её шансами воздействия низкоинтенсивным лазерным облучением. Лазерная медицина 2009; 13: 35-39.

5. Глуценко Н.Н., Богословская О.А., Ольховская И.П. Сравнительная токсичность солей и наночастиц металлов и особенность их биологического действия. *Нанотехнология - технология XXI века* М. 2006; 93-95.
6. Никифорова Т. Е. Омельченко Э. Н. Соболев Магнитное управление распределением ферромагнитных наночастиц в биотканях при лазерном изменении формы. *Энциклопедия инженера-химика* 2009; 5: 19–22.
7. Омельченко А. И. Оптомеханические испытания гидратированных биотканей при лазерном изменении их размеров и формы. *Квантовая электроника* 2008; 38(3): 269–272.
8. Рахметова А.А., Алексеева Т.П., Богословская О.А., Лейпунский И.О., Ольховская И.П., Жигач А.Н., Глуценко Н.Н. Ранозаживляющие свойства наночастиц меди в

- зависимости от их физико-химических характеристик. *Российские нанотехнологии*.2010; 3-4: 102-107.
9. Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., and Urban P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 2009; 2587–2595.
10. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S.-I., Tsutsumi Y. and Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009; 496–501.
11. Tuner J., Hode. L. *Laser therapy in dentistry and medicine*. Prima Books 2006; 236.

Поступила 27.03.2013 г.

References

1. Alipov V.V., Lebedev M.S., Tsatsaev Kh.M., Alipov N.V., Dobreikin E.A., Urusova A.I. Experimental laser nanosurgical technologies. First results and prospects. *Vestnik eksperimental'noi i klinicheskoi khirurgii*, 2011; 2: 330-333. – (In Russian).
2. Babushkina I.V., Borodulin B.V., Korshunov G.V. Puchin'ian V.M. The study of antibacterial action of copper and iron nanoparticles on clinical strains of Staphylococcus aureus. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal*, 2010; 1: 11-14. – (In Russian).
3. Brill' G.E., Petrosian V.I., Zhitneva E.A. New information about the restructuring of bioliquids under the influence of low-intensity laser radiation. *Fizicheskaja meditsina*, 1996; 1-2: 39-40. – (In Russian).
4. Gadzhiev E.A., Eliseenko V.I. The morphological features of healing purulent wounds because of traditional treatment and potentiating it by impacts low-intensity laser irradiation. *Lazernaia meditsina*, 2009; 13: 35-39. – (In Russian).
5. Glushchenko N.N., Bogoslovskaja O.A., Ol'khovskaia I.P. *Sravnitel'naja toksichnost' solei i nanochastits metallov i osobennost' ikh biologicheskogo deistviia. Nanotekhnologija - tekhnologija XXI veka* [Comparative toxicity of salts and metal nanoparticles and the singularity of their biological effects. *Nanotechnology - the technology of the XXI century*]. Moscow, 2006. 95 p. – (In Russian).
6. Nikiforova T.E. Omel'chenko E.N. Sobol' Magnetic control of the distribution of ferromagnetic nanoparticles in biological tissues by laser reshaping. *Entsiklopediia inzhenera-khimika*, 2009; 5: 19–22. – (In Russian).
7. Omel'chenko A.I. Optomechanical tests of hydrated biological tissues by laser change their size and shape. *Kvantovaja elektronika*, 2008; 38(3): 269–272. – (In Russian).
8. Rakhmetova A.A., Alekseeva T.P., Bogoslovskaja O.A., Leipunskii I.O., Ol'khovskaia I.P., Zhigach A.N., Glushchenko N.N. Wound healing properties of copper nanoparticles, depending on their physical and chemical characteristics. *Rossiiskie nanotekhnologii*, 2010; 3-4: 102-107. – (In Russian).
9. Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., and Urban P. L. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 2009; 2587–2595.
10. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S.-I., Tsutsumi Y. and Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009; 496–501.
11. Tuner J., Hode. L. *Laser therapy in dentistry and medicine*. Prima Books, 2006. 236 p.

Received 27.03.2013

Информация об авторах

1. Алипов Владимир Владимирович – д.м.н., проф., заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И.Разумовского; e-mail: vladimiralipov@yandex.ru
2. Добрейкин Евгений Алексеевич – аспирант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И.Разумовского
3. Урусова Алина Ивановна – соискатель кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И.Разумовского
4. Беляев Павел Александрович – студент Саратовского государственного медицинского университета им. В.И.Разумовского

Information about the Authors

1. Alipov V. – MD, Professor, Head of Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky; e-mail vladimiralipov@yandex.ru
2. Dobreikin E. – graduate student Hard of Department of operative surgery and topographic Anatomy Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky
3. Urusova A. – graduate student Hard of Department of operative surgery and topographic Anatomy Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky
4. Belaev P. – student Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky