

Л. С. РЕЗНІЧЕНКО, кандидат біологічних наук
С. М. ДИБКОВА, кандидат біологічних наук
Т. Г. ГРУЗІНА, кандидат біологічних наук
 Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ
В. П. РИЖЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор
С. А. НИЧИК, доктор ветеринарних наук
Г. Ф. РИЖЕНКО, кандидат біологічних наук
О. І. ГОРБАТЮК, кандидат ветеринарних наук
В. О. АНДРІЯЩУК, кандидат ветеринарних наук
 Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА СУБСТАНЦІЯ НАНОЧАСТИНОК МІДІ: ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОЦІНКА АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ *IN VITRO*

У статті наведені результати фізико-хімічної характеристики експериментальної субстанції наночастинок міді, оцінки їх біобезпечності та дослідження антимікробної активності *in vitro* відносно спектру тестових штамів мікроорганізмів. Субстанція сферичних наночастинок міді 20 нм охарактеризована як біобезпечна за показниками цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності, фізіологічними та біохімічними маркерами. Установлено висока антимікробна активність дослідженої субстанції наночастинок проти широкого спектру тестових культур патогенних штамів мікроорганізмів.

Ключові слова: наночастинок міді, фізико-хімічна характеристика, біобезпечність, антимікробна активність.

Ефективна антибактеріальна терапія наразі є обов'язковою складовою комплексного лікування як продуктивних сільськогосподарських, так і дрібних домашніх тварин та птахів. Водночас, неконтрольоване застосування антибіотиків у гуманній та ветеринарній медицині, яке спостерігалось продовж останніх десятиліть, призвело до появи збудників, резистентних до класичних антимікробних засобів [1]. Наслідком цього стало значне зниження ефективності традиційної антимікробної терапії. Так, наприклад, незважаючи на сучасні досягнення у створенні синтетичних антибіотиків, сальмонельоз свиней усе ще відноситься до економічно значущих хвороб, що постійно реєструються на території України та інших держав. Захворюваність поросят на сальмонельоз у середньому сягає 30–40 відсотків, а летальність – 50 відсотків. У птахівництві найбільш частою причиною загибелі поголів'я залишається колібактеріоз та сальмонельоз. Серед поголів'я великої рогатої худоби значного поширення набули бактеріози [1, 3].

Враховуючи вище зазначене, актуальним стає пошук нових високоефективних антимікробних субстанцій широкого спектру дії. Перспективними в цьому напрямку визнано наночастинок металів, зокрема – наночастинок міді [4–6].

Метою роботи було вивчення фізико-хімічної характеристики експериментальної субстанції наночастинок міді, оцінка їх біобезпечності та дослідження антимікробної активності *in vitro* проти широкого спектру тестових штамів мікроорганізмів.

Матеріал і методи досліджень. Експериментальна субстанція наночастинок міді (CuNP), використана у роботі, синтезована методом хімічної конденсації у водному середовищі за оригінальним протоколом, розробленим у Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України. Концентрація водної дисперсії наночастинок міді складала 64,0 мг/мл за металом.

Розмір і форму наночастинок міді визначали методом трансмісійної електронної мікроскопії (трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230, «JEOL LTD», Японія).

Хімічний склад наночастинок міді аналізували шляхом рентгеноструктурного мікроаналізу методом енергодисперсійної рентгєнівської спектроскопії (енергодисперсійний спектрометр IETEM 250 з детектором X-Max 80, Oxford Instruments Analytical, Великобританія для трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230, «JEOL LTD», Японія).

Біобезпечність синтезованої субстанції наночастинок у тестах *in vitro* визначали за показниками цитотоксичності, мутагенності, молекулярно-генетичного (показник генотоксичності), фізіологічного («стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини») та біохімічних (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) маркерів згідно протоколів Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол №8 від 26.09.2013 р.) [7].

Антимікробну активність експериментальної субстанції наночастинок міді стосовно тестових штамів мікроорганізмів визначали методом серійних розведень в агарі згідно МУК 4.2.1890-04, 2004 [8]. Використано наступні тестові штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* 209P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* 144 та *Candida albicans*. Кінцева засівна доза тестових мікроорганізмів на чашках становила 10^3 , 10^4 та 10^5 КУО/см³. Ефективність антимікробної дії наночастинок міді досліджували за їх кінцевою концентрацією у середовищі визначення (середовище Мюллера-Хінтона) – 6,4 мг/мл за металом. Стерильні препарати наночастинок міді вносили у стерильне поживне середовище Мюллера-Хінтона, охолоджене до 50 °С, перемішували та розливали у чашки Петрі. Культивування мікроорганізмів здійснювали у термостаті за температури 37°С продовж 24 годин.

Результати досліджень.

За вивчення фізико-хімічної характеристики експериментальної субстанції наночастинок міді (визначення розміру і форми частинок), проведеної методом трансмісійної електронної мікроскопії, встановлено, що наночастинок мали сферичну форму та середній розмір 20 нм (рис. 1).

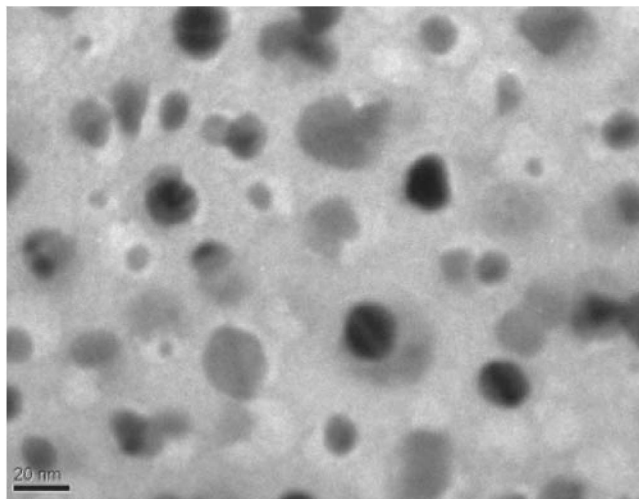


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення експериментальної субстанції наночастинок міді (CuNP)

Результати рентгеноструктурного мікроаналізу хімічного складу експериментальної субстанції наночастинок міді, проведеного методом енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії, показані на рис. 2.

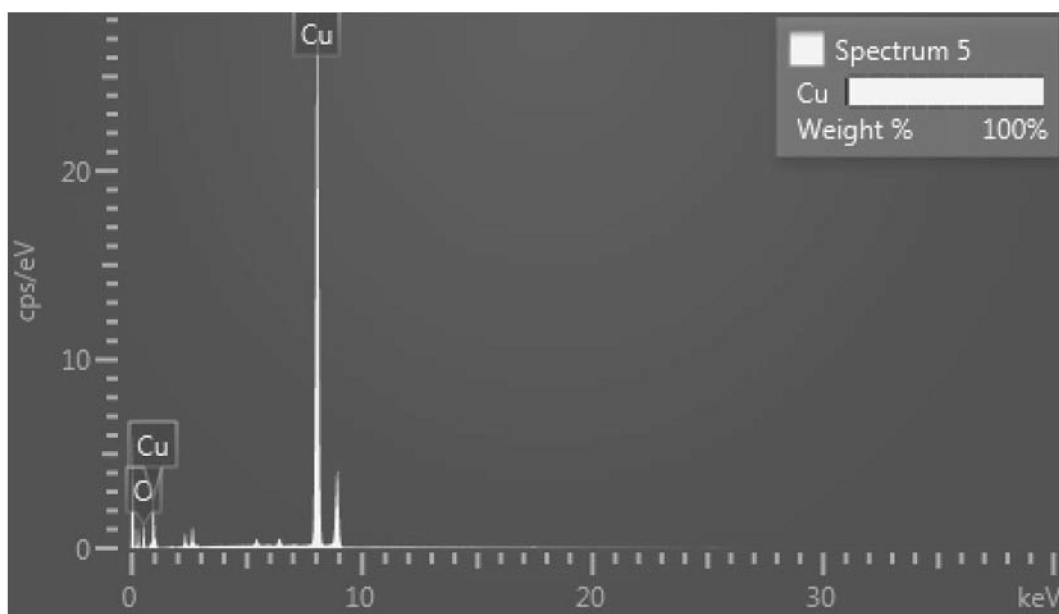


Рис. 2. Рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу експериментальної субстанції наночастинок міді (CuNP)

Одержані дані засвідчили, що у складі наночастинок вміст міді (Cu) становить 100 відсотків (рис. 2). Присутність у структурі частинки кисню не зафіксовано, що свідчить про те, що аналізовані наночастинки є частинками нуль-валентної міді (Cu⁰NP). Оксиди та гідроксиди міді за мікроаналізу хімічного складу наночастинок не виявлені.

Наступним етапом була оцінка біобезпечності експериментальної субстанції наночастинок міді.

Біобезпечність наночастинок міді у тестах *in vitro* оцінювали за показниками цитотоксичності, мутагенності, генотоксичності, «стан мікрофлори плунково-кишкового тракту людини», та біохімічних маркерів (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) згідно вимог до паспорту безпеки наноматеріалу [7].

Так, у зразках тестових еукаріотичних клітин лінії CHO-K1, оброблених наночастинками міді у широкому концентраційному діапазоні, не зафіксовано цитотоксичного впливу дослідженого наноматеріалу.

Генотоксичного впливу субстанції наночастинок міді на тестові клітини також не виявлено. Взаємодія досліджених наночастинок з тестовими еукаріотичними клітинами не призводила до появи первинних ДНК-пошкоджень, порівняно із впливом N-нітрозометилсечовини, яка є відомим генотоксикантом (рис. 3, А).

Типові електрофоретичні зображення ДНК клітин, оброблених наночастинками міді представлені на рис. 3, Б.

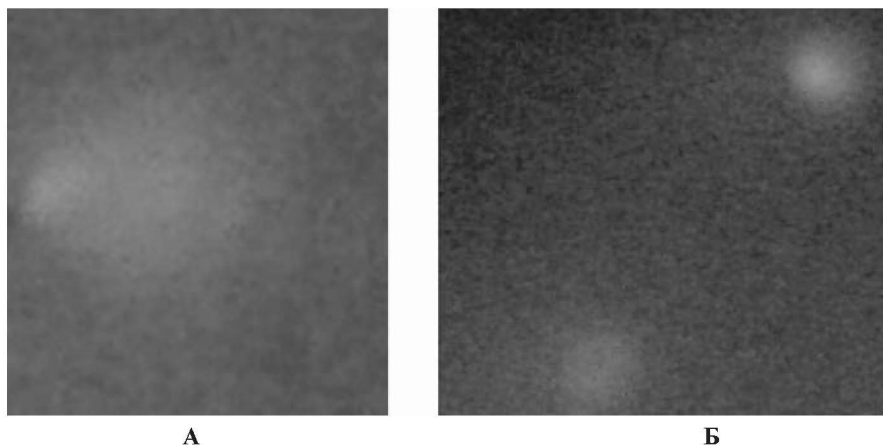


Рис. 3. Електрофоретичні зображення: А- ДНК, пошкодженої N-нітрозометилсечовиною (позитивний контроль – відомий генотоксикант); Б – ДНК, не пошкоджена під впливом експериментальної субстанції наночастинок міді

Показник пошкоджень ДНК («індекс ДНК-комет» ($I_{\text{ДНК-комет}}$)) під впливом субстанції наночастинок міді у різних концентраціях, сягав значень, близьких до $I_{\text{ДНК-комет}}$ негативного контролю (нативні клітини).

Біобезпечність наночастинок міді за показником «стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини» визначали за характером впливу експериментальної субстанції *in vitro* на пробіотичні культури *Lactobacillus acidophilus* AH200, *Bifidobacterium bifidum* L, *Escherichia coli* M-17. Була встановлена відсутність токсичного впливу субстанції наночастинок міді у дослідженому концентраційному діапазоні: статистично достовірного зменшення кількості КУО пробіотичних культур у присутності наночастинок міді не виявлено.

Визначення особливостей впливу наночастинок міді на біохімічні маркери безпеки наночастинок металів (АТР-азну активність сумарної мембранної фракції тестових еукаріотичних клітин лінії CHO-K1 та лактатдегідрогеназу активність їх цитозольної фракції) не виявило токсичного впливу субстанції у обох випадках.

Субстанція наночастинок міді характеризувалась як біобезпечна в тестах на мутагенність з використанням поліхроматофілних еритроцитів кісткового мозку тварин.

Таким чином, встановлено, що експериментальна субстанція наночастинок міді в умовах *in vitro* є біобезпечною за визначеними маркерами.

Наступним етапом досліджень було визначення антимікробної активності експериментальної субстанції наночастинок міді 20 нм відносно широкого спектру тестових штамів мікроорганізмів.

У таблиці 1 наведені результати аналізу *in vitro* антимікробної активності експериментальної субстанції наночастинок міді у відношенні до патогенних тест-штамів мікроорганізмів: *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. aureus* 209P, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 2592, *S. sonnei*, *S. typhimurium* 144 та *Candida albicans*.

Таблиця 1.

Оцінка антимікробної активності експериментальної субстанції наночастинок міді розміром 20 нм у відношенні до патогенних тестових штамів мікроорганізмів

Тест-штам	Засівна доза тестового штаму КУО/см ³	Ріст тест-штамів у присутності наночастинок міді у середовищі визначення у концентрації 6,4 мг/мл за металом	Контрольний ріст тест-штаму
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 43300	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Shigella sonnei</i>	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Salmonella typhimurium</i> 144	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++
<i>Candida albicans</i>	10 ³	ріст відсутній	++++
	10 ⁴	ріст відсутній	++++
	10 ⁵	ріст відсутній	++++

Примітка: «++++» - інтенсивний ріст тест-штаму.

Установлено, що субстанція наночастинок міді 20 нм мала виражену антимікробну активність у відношенні до усіх досліджених патогенних тест-культур: повне інгібування росту тестових штампів спостерігалось за кінцевої засівної дози мікроорганізмів на чашках як 10^3 і 10^4 , так і 10^5 КУО/см³.

Висновки.

1. За даними фізико-хімічної характеристики експериментальної субстанції наночастинок міді встановлено, що частинки мали сферичну форму і середній розмір 20 нм.

2. Рентгеноструктурним мікроаналізом хімічного складу експериментальної субстанції наночастинок міді (CuNP) виявлено, що аналізовані наночастинки є частинками нуль-валентної міді (Cu⁰NP).

3. Установлена виражена антимікробна активність експериментальної субстанції наночастинок міді розміром 20 нм у відношенні до широкого спектру патогенних тест-культур: *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *S. aureus* 209P, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 2592, *S. sonnei*, *S. typhimurium* 144 та *Candida albicans*.

Перспективи подальших досліджень. В аспекті вивчення антимікробної активності експериментальної субстанції наночастинок міді як діючої речовини за створення антибактеріальних препаратів актуальними є дослідження, спрямовані на визначення характеру впливу наночастинок міді у моделях бактеріальних уражень тварин *in vivo*.

Список використаної літератури

1. Субботин В. В., Данилевская Н. В. Антибактериальная терапия в ветеринарной практике / В. В. Субботин, Н. В. Данилевская // VetPharma. – 2011. – №1. – <http://vetpharma.org/articles/28/137/>

2. Айшпур О. Є. Сальмонельоз свиней. Легенева форма сальмонельозу / О. Є. Айшпур // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 24. – С. 3-10.

3. Бобылева Г. А. Состояние и перспективы развития отрасли птицеводства / Г. А. Бобылева // Материалы VI Международного ветеринарного конгресса по птицеводству. – Москва, 2010. – С. 7-14.

4. Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite / A. Esteban-Cubillo, C. Pecharrómán, E. Aguilar [et al.] // Journal of Materials Science. – 2006. – Vol. 41, № 16. – P. 5208-5212.

5. Ren G., Hu D., Cheng E.W. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications / G. Ren, D. Hu, E.W. Cheng [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2009. – Vol. 33, № 6. – P. 587-590.

6. Theivasanthi T., Alagar M. Studies of copper nanoparticles effects on micro-organisms / T. Theivasanthi, M. Alagar // Annals of Biological Research. – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 368-373.

7. Методичні рекомендації «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджені Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол №8 від 26.09.2013). – Київ, 2013. – 108 с.

8. Методические указания МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // Клини. микробил. антимикроб. химиотер. – 2004. – Т.6, №4. – С. 306-359.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА СУБСТАНЦІЯ НАНОЧАСТИЦ МІДІ: ХАРАКТЕРИСТИКА І ОЦІНКА АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ IN VITRO / Л. С. Резниченко, С. Н. Дыбкова, Т. Г. Грузина, В. П. Рыженко, Г. Ф. Рыженко, О. И. Горбатюк

В статті представлені результати фізико-хімічної характеристики експериментальної субстанції наночастиць міді, оцінки їх біобезопасності і изучения антимікробної активності in vitro относительно спектра тестових штаммов мікроорганізмів. Субстанція сферических наночастиць міді 20 нм охарактеризована як біобезопасная по показателям цитотоксичности, генотоксичности, мутагенности, физиологическому и биохимическим маркерам. Установлена высокая антимікробная активність исследованной субстанції наночастиць в отношении широкого спектра тестових культур патогенных штаммов мікроорганізмів.

Ключевые слова: наночастицы меди, физико-химическая характеристика, биобезопасность, антимікробная активність.

EXPERIMENTAL SUBSTANCE OF COPPER NANOPARTICLES: CHARACTERISTIC AND ESTIMATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VITRO / L. S. Rieznicenko, S. N. Dybkova, T. G. Gruzina, V. P. Ryzhenko, G. F. Ryzhenko, O. I. Gorbatyuk

The article presents the results of physico-chemical characteristics of the experimental substance of copper nanoparticles, their biosafety evaluation and study of antimicrobial activity in vitro relative to the spectrum of test strains of microorganisms. The substance of spherical copper nanoparticles 20 nm is characterized as biosafe according to the parameters of cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, physiological and biochemical markers. High level of antimicrobial activity for the studied substance of nanoparticles has been revealed concerning wide spectrum of test cultures of pathogen microorganisms.

Key words: copper nanoparticles, physico-chemical characteristics, biosafety, antimicrobial activity.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **І. В. Галка**.

Рукопис надійшов 24.09.2014 року.