УДК 616.34-002-022.7:576.851.48]:612.111:546.57-022.532-074

ИЗМЕНЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ESCHERICHIACOLI И PSEUDOMONASAERUGINOSA ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Шуб Г.М., Шаповал О.Г., Вельмакин С.Е., Сакулина Л.Б.

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: ogshapoval@gmail.com

Возможность местного использования наночастиц различных металлов, включая серебро, как антимикробных факторов предусматривает их способность воздействовать на первый этап развития инфекции – процесс адгезии. Проведена оценка влияния наночастиц серебра на адгезивную активность 5 штаммов Pseudomonasaeruginosa и 4 штаммов Escherichiacoli. Предварительно методом двукратных серийных разведений в мясопептонном бульоне определена минимальная задерживающая концентрация (МЗК) наночастиц и антибиотика гентамицина как препарата сравнения. Адгезивную активность изучали по способности суточных чистых культур прикрепляться к эритроцитам человека 0(1) Rh(+) после культивирования в мясопептонном бульоне, содержащем субингибирующие концентрации (¼МЗК) гентамицина и наночастиц. Установлено, что опытные концентрации наночастиц серебра и гентамицина угнетают адгезию штаммов обоих видов. У большинства штаммов ее снижение в присутствии наночастиц было более существенно по сравнению с гентамицином.

Ключевые слова: наночастицы серебра, адгезия, Escherichiacoli, Pseudomonasaeruginosa

CHANGING OF ADHESIVE ACTIVITY OF ESCHERICHIA COLI AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA UNDER THE INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES

Shub G.M., Shapoval O.G., Velmakin S.E., Sakulina L.B.

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail:ogshapoval@gmail.com

Possibility of application of different metal nanoparticles as antimicrobial agents including silver nanoparticles provides their ability to affect adhesive process as a first stage of infection development. Influence of silver nanoparticles on adhesion of Escherichia coli (four strains) and Pseudomonas aeruginosa (five strains) was investigated. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the silver nanoparticles and antibiotic gentamycin as drug of comparison were determined using serial two-fold dilution method. After cultivation in meat-pepton broth containing subinhibitory concentrations (¼MIC) of gentamycin and the nanoparicles the adhesive activity of overnight pure cultures was estimated by an average index of adhesion on human erythrocytes 0(1) Rh(+). The study observed that the experimental concentrations of the silver nanoparticles and gentamycin inhibit adhesion of the strains of both species. In the presence of the nanoparticles inhibiton of adhesive activity of the majority of the strains was more significantly in comparison with gentamycin.

Keywords: silvernanoparticles, adhesion, Escherichiacoli, Pseudomonasaeruginosa

Антимикробная активность наночастиц различных металлов, в том числе серебра, в настоящее время широко изучается и достаточно высока в отношении различных видов микроорганизмов. Одним из направлений практического использования наночастиц серебра является местное применение, в том числе в лечении и профилактике гнойной инфекции. К числу основных возбудителей последней относится Pseudomonasaeruginosa, которая имеет особое значение при внутрибольничных инфекциях благодаря широкому распространению в окружающей среде и способности быстро колонизировать ее объекты с формированием биопленок, а также Escherichiacoli. Данные виды относятся к грамотрицательным бактериям, имеющим в клеточной стенке липополисахаридный компонент, затрудняющий проникновение в клетку ряда веществ, в том числе некоторых антибиотиков [2, 5]. К тому же псевдомонады обладают природной устойчивостью ко многим липофильным антибиотикам (тетрациклинам, хлорамфениколу, ряду фторированных хинолонов) и способны образовывать внеклеточную слизь, которая может служить дополнительным механизмом переживания воздействия неблагоприятных факторов, среди которых нельзя исключить и наночастицы серебра [2]. В формировании биопленки как в условиях макроорганизма, так и вне его одним из стартовых механизмов является адгезия, поэтому возможность прерывания или замедления развития этого процесса под воздействием наночастиц серебра имеет теоретическое и практическое значение.

Целью нашего исследования послужила оценка влияния наночастиц серебра на адгезивную активность штаммов P.aeruginosa и E.coli.

Материал и методы исследования

В работе использованы 9 штаммов – один стандартный штамм (P.aeruginosa ATCC 27853) и по 4 клинических штамма каждого вида, выделенных от больных с гнойной инфекцией мягких тканей. Коллоидный

раствор наночастиц серебра кубической формы с размером граней 20 нм любезно предоставлен Институтом биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии наук. Предварительно у опытных штаммов методом двукратных серийных разведений в мясопептонном бульоне определяли минимальную задерживающую концентрацию (МЗК) наночастиц серебра и аминогликозида гентамицина как препарата сравнения [4]. Суточные чистые культуры штаммов в течение суток инкубировали в мясопептонном бульоне, содержащем субингибирующие концентрации (1/4 МЗК) наночастиц и антибиотика, используя также посевы без обоих веществ в качестве контроля. Микробная нагрузка составила $2 \cdot 10^5$ микробных тел/мл по стандарту мутности McFarland. Адгезивную активность изучали экспресс-методом, предложенным В.И. Брилис и соавторами, на свежих эритроцитах O(I) Rh(+) [3]. Для этого эритроциты трижды отмывали 0,1 М раствором фосфатного буфера путем центрифугирования и готовили взвесь эритроцитов концентрацией 10^8 клеток/мл. На чистом обезжиренном предметном стекле суспензировали по одной бактериологической петле бульонной культуры каждого штамма и одной капле взвеси эритроцитов. После 30 минут инкубации при 37°С во влажной камере предметные стекла высушивали и фиксировали жаром, после чего окрашивали водным фуксином. Адгезивную активность каждой опытной культуры оценивали при иммерсионной микроскопии, подсчитывая количество бактериальных клеток, прикрепившихся к 5 эритроцитам в каждом из пяти просмотренных полей зрения, и рассчитывая средний показатель адгезии (СПА) как среднюю арифметическую. Микроорганизмы при СПА 1,01–2,0 считали низкоадгезивными, 2,01–4,0 – среднеадгезивными, более 4,0 – высокоадгезивными. Статистическую обработку проводили согласно методике оценки существенности различий между найденными в опыте средними величинами, то есть СПА [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Все взятые в опыт культуры были чувствительны к гентамицину согласно полученным значениям МЗК 0,125–8 мкг/мл [4]. МЗК наночастиц серебра для всех штаммов E.coli составила 5 мкг/мл, для штамма P.aeruginosaATCC 27853 – 80, клинических штаммов P. aeruginosa № 2, 4 – 5 мкг/мл, № 3 – 20 мкг/мл.

Все штаммы E.coli обладали высокой адгезивной активностью: СПА 5,04 – 7, 4 штамма P.aeruginosa (стандартный, № 2, 3, 4) – средней (СПА 2,32 – 3,64) и один штамм (№ 1) – высокой (СПА 5,95) адгезивной активностью (таблица). После культивирования в субингибирующих концентрациях гентамицина адгезивная активность согласно значениям СПА существенно снизилась по сравнению с контролем у 2 штаммов P.aeruginosa (№ 1 – СПА 3,08 ± 1,19 и № 4 – СПА 1,32 ± 0,46), у стандартного штамма умеренно возросла (СПА 4,6 ± 0,49), у штаммов №№ 2, 3 ее достоверного изменения не произошло. Культивирование в данных условиях также привело к снижению адгезивной активности по сравнению с контролем у всех штаммов E.coli (СПА штамма № 1 – 2 ± 0,8, № 2 – 1,96 ± 0,77, № 3 – 1,56 ± 0,63, № 4 – 1,24 ± 0,42 при соответствуюших контрольных значениях 5,04 ± 1,14, 6,88 ± 0,81, 7 ± 0,93 и 5,84 ± 1,04).

СПА штаммов P.aeruginosa и E.coli

Штаммы	Значения СПА в зависимости от условий культивирования		
	Контроль	1/4 МЗК гентамицина	1/4 МЗК наночастиц серебра
P.aeruginosa ATCC 27853	3,64 ± 1,09	4,6 ± 0,49	2,92 ± 0,89
P. aeruginosa № 1	5,95 ± 1,21	3,08 ± 1,19	1,8 ± 0,63
P. aeruginosa № 2	2,32 ± 0,73	2,84 ± 0,92	1,16 ± 0,37
P.aeruginosa № 3	3,28 ± 1,11	3,28 ± 0,6	2,4 ± 0,8
P.aeruginosa № 4	2,92 ± 0,56	1,32 ± 0,46*	1,21 ± 0,41*
E.coli № 1	5,04 ± 1,14	2 ± 0,8	1,56 ± 0,63
E.coli № 2	6,88 ± 0,81	1,96 ± 0,77	1,4 ± 0,48
E.coli № 3	7 ± 0,93	1,56 ± 0,63*	1,44 ± 0,49*
E.coli № 4	5,84 ± 1,04	1,24 ± 0,42*	1,36 ± 0,55*

Примечание. * – недостоверные различия между значениями СПА после культивирования в 1/4 МЗК гентамицина и 1/4 МЗК наночастиц.

После культивирования в субингибирующих концентрациях наночастиц у всех штаммов обоих видов отмечалось существенное по сравнению с контролем снижение СПА. При этом значения СПА 4 штаммов P.aeruginosa и 2 штаммов E.coli, культивированных в субингибирующих концентрациях наночастиц, были достоверно ниже, чем в условиях культивирования в субингибирующих концентрациях гентамицина: СПА штаммов псевдомонад – P.aeruginosa ATCC 27853, № 1, 2 и 3, E.coli № 1,2 после культивирования в 1/4 МЗК гентамицина – 4,6 ± 0,49, 3,08 ± 1,19, 2,84 ± 0,92 и 3,28 ± 0,6, 2 ± 0,8, 1,96 ± 0,77, в то время как после культиви-

рования в 1/4 МЗК наночастиц – 2,92 ± 0,89, 1,8 ± 0,63, 1,16 ± 0,37 и 2,4 ± 0,8, 1,56 ± 0,63, 1,4 ± 0,48 соответственно.

Таким образом, наночастицы серебра в субингибирующих концентрациях угнетают адгезивную активность опытных штаммов P.aeruginosa и E.coli как представителей грамотрицательных бактерий, независимо от липидной составляющей их клеточной стенки и наличия внеклеточной слизи у псевдомонад. Известно, что через клеточную стенку грамотрицательных бактерий транспорт водорастворимых антибиотиков осуществляется через пориновые каналы липополисахаридного слоя, диаметр которых составляет 2 нм [5]. При этом для аминогликозидов характерно самопромотирующее действие в процессе проникновения в клетку (благодаря поликатионной химической структуре они связываются с анионами липолисахарида и вызывают в нем конформационные изменения, повышая проницаемость липополисахаридного слоя) [2, 8]. Подобный механизм проникновения может способствовать и проникновению наночастиц серебра с размерами большими, чем пориновые каналы. Механизм действия наночастиц серебра на грамотрицательные бактерии обусловлен, во-первых, взаимодействием их с внешней мембраной, которое приводит к формированию так называемых воронок, в месте которых повышается ее проницаемость, а во-вторых, с индукцией свободно-радикального повреждения мембран [6, 9, 10]. Адгезия грамотрицательных бактерий, в том числе P.aeruginosa, происходит к поверхности эукариотических клеток за счет пилей, кончики которых контактируют со специальными участками клеточной мембраны, проходя через них как через воротничок для закрепления на внутренней стороне [7]. Очевидно, что действие наночастиц серебра и гентамицина имеет общий результат – деструкцию цитоплазматической мембраны, а, как следствие, цитолиз клеток и повреждение фимбриальных адгезинов – выростов цитоплазмы бактериальной клетки. Благодаря этому они не уступают друг другу по способности нарушать адгезивную активность опытных штаммов.

Выводы

Субингибирующие концентрации наночастиц серебра (1/4 МЗК) угнетают адгезивную активность опытных штаммов P.aeruginosa и E.coli, не уступая подобному эффекту гентамицина и даже превосходя его для большинства опытных штаммов. Это делает перспективным применение препаратов наночастиц не только для местного лечения инфекций, вызываемых данными видами бактерий, но и профилактики их возникновения.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

2. Госпитальные инфекции, вызванные Pseudomonasaeruginosa. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности / С.В. Сидоренко, С.П. Резван, Г.А. Стерхова, С.А. Грудинина //Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 3. – С. 25–34.

3. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т. А. Брилене, Х.П. Ленцнер, А.А. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.

4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам // МУК 4.2.1890-04. – М.: Издательский отдел Федерального центра Госсанэпиднадзора Минздрава РФ, 2004. 91 с.

5. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. – М.: Мир, 1984. – 240 с.

6. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J.S. Kim DVM, Ph. Da, E.Kuk MSb et al. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 3. – Is. 1. – P. 95–101.

7. Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of Pseudomonas aeruginosa pili by using atomic force microscopy / Ah. Touhami, M.H. Jericho, Jessica M. Boyd, T.J. Beveridge // Journal of bacteriology. – 2006. – Vol. l88. – № 2. – P. 370–377.

8. Peterson A.A., Hancock R.E., McGroarty E.J. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa // Journal of Bacteriology. – 1985. – Vol. 164. – № 3. – P. 1256–1261.

9. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria// Journal of colloid and interface science. – 2004. – Vol. 275. – № 1. – P. 177–182.

10. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient / K. Cho, J. Park, T. Osaka, S. Park // Electrochimica acta. – 2005. – № 51. – P. 956–960.

References

1. Ashmarin I.P., Vorobev A.A. *Statisticheskiemetody v mikrobiologicheskih issledovanijah* (Statistical technology in microbiological researches). Leningrad: Medgiz, 1962. 180p.

2. Sidorenko S.V., Rezvan S.P., Sterhova G.A., Grudinina S.A. *Antibiotiki i himioterapija*, 1999, no.3, pp. 25–34.

3. Brilis V.I., Brilene T.A., Lencner H.P., Lencner A.A. *Laboratornoedelo*, 1986, no.4, pp. 210–212.

4. Opredelenie chuvstvitelnosti mikroorganizmov k antibakterialnym preparatam (Testing of sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs). Metodicheskieukazanija 4.2.1890–04. M.: Izdatelskijotdel Federalnogocentra Gossanjepidnadzora Minzdrava RF, 2004. 91p.

5. Franklin T., Snou Dzh. Biohimija antimikrobnogo dejstvija (Biochemistry of antimicrobial action). M.: Mir, 1984. 240 p.

6. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J.S. Kim DVM, Ph. Da, E.Kuk MSb et al. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2007. Vol.3. Is. 1. pp. 95–101.

7. Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of Pseudomonas aeruginosa pili by using atomic force microscopy / Ah. Touhami, M.H. Jericho, Jessica M. Boyd, T.J. Beveridge // Journal of bacteriology. 2006. Vol. l88. no. 2. pp. 370–377.

8. Peterson A.A., Hancock R.E., McGroarty E.J. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa // Journal of Bacteriology. 1985. Vol. 164. no. 3. pp. 1256–1261.

9. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria // Journal of colloid and interface science. 2004. Vol. 275. no. 1. P. 177–182.

10. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient / K. Cho, J. Park, T. Osaka, S. Park // Electrochimica acta. 2005. no. 51. pp. 956–960.

Рецензенты:

Щербаков А.А., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологи и иммунологии, «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», г. Саратов;

Тихомирова Е.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой экологии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 22.05.2013.