

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 579.864.1:577.151.

С. М. Дибкова

ОЦІНКА СТАНУ МІКРОФЛОРИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЛЮДИНИ ПРИ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА І СРІБЛА

Інститут біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ)

Робота виконана в рамках плану науково-дослідних робіт відділу колоїдної технології природних систем Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України (зав. — д.х.н., професор Ульберг З. Р.): тема № 2.16.1.7., Державний реєстраційний номер 0107U008520 «Дослідження колоїдно-хімічних і молекулярних механізмів біотрансформації ультрадисперсних фаз металів в клітинних і біомінеральних системах»; Проекту «Молекулярні механізми взаємодії, транспорту та трансформації наночастинок в біологічних системах як основа створення засобів цільової терапії» програми «Наноструктурні системи, наноматеріали, нанотехнології» (розділ «Біонаносистеми») (№ Державної реєстрації 0108U005964) — 2008–2009 рр.

Вступ. Використання наноматеріалів є одним із найперспективніших напрямків розвитку науки, біотехнології та медицини ХХІ сторіччя. За визначенням [6], «нанотехнологія — це сукупність наукових знань, способів і засобів спрямованого регульованого синтезу різних речовин, матеріалів та виробів з лінійним розміром елементів структури в діапазоні 1 — 100 нм». Особливої уваги заслуговують наночастинок металів (НЧМ), зокрема золота і срібла. Їх унікальні властивості і, перш за все, біологічна активність можуть бути використані для ефективної боротьби з небезпечними інфекціями (технології отримання комплексних імунобіологічних препаратів, модуляція ефективності вакцин), для цільової доставки лікарських препаратів в онкології, для потреб генної та молекулярної інженерії, створення пробіотичних препаратів [4,8, 9,10]. Сформувався навіть такий напрямок як наномедицина, що вивчає можливість застосування нанотехнологічних розробок в медичній практиці для профілактики, діагностики та лікування захворювань різної етіології [8].

Однак, широкому застосуванню наноматеріалів повинне передувати детальне вивчення можливих ризиків для здоров'я людини та стану навколишнього середовища. Такі дослідження можуть бути адекватними за використання ключових характеристик живого організму, які чутливі до токсичної дії. Однією з таких характеристик є стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини.

Метою дослідження було вивчення біосумісності наночастинок золота та срібла, перспективних в біотехнології, наномедицині та ветеринарії, шляхом оцінки стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини.

Об'єкт і методи дослідження. Наночастинок золота синтезували шляхом відновлення аурату калію ацетоном або етанолом методом Девіса [5]. Вихідною речовиною слугувала золотохлористоводнева кислота $\text{H}[\text{AuCl}_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Наночастинок срібла отримували конденсаційним методом шляхом відновлення AgNO_3 [5]. Розмір отриманих наночастинок обчислювали з використанням методу лазерно-кореляційної спектроскопії (ЛКС). Вимірювання проводили на лазерно-кореляційному спектрометрі Zetasizer-3 («Malvern Instruments Ltd», Великобританія).

В роботі були використані НЧМ: золота — розміром 20,30 нм в концентраціях: 20 нм — 3,0 мкг/мл; 11,0·10⁻⁵ мкг/мл; 30 нм — 3,5 мкг/мл; 14,0·10⁻⁵ мкг/мл та срібла — розміром 30 нм у концентраціях 21,5 та 86,0·10⁻⁵ мкг/мл за металом. Вибір концентрацій обумовлений отриманими раніше результатами по концентраційним особливостям впливу наночастинок золота та срібла на бактеріальні клітини [2,3, 5,7]. НЧМ вносили в інкубаційне середовище у вигляді стерильної водної дисперсії.

Дослідження проводили з використанням тестових штамів бактерій типових пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* 317/402, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia*

coli M-17 із колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (Київ, Україна).

Оцінку стану мікрофлори ШКТ при дії НЧМ здійснювали шляхом вивчення їх взаємодії з типовими представниками нормофлори ШКТ *in vitro* та в моделях, що імітують умови травлення людини. При цьому здійснювали підрахунок колонієутворюючих одиниць (КУО) пробіотичних культур в присутності наночастинок та без них (контроль) та наявність типових колоній та клітин типової морфології при мікроскопічному аналізі мазків з культуральних середовищ.

Культивування пробіотичних культур здійснювали в таких поживних середовищах: для лактобацил — знежирене 10 % стерилізоване молоко; для біфідобактерій — бактофок; для *E.coli* — МПА та середовища Кесслера, Ендо з додаванням відповідних концентрацій НЧМ при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Після чого здійснювали пересівання культуральної рідини на відповідні агаризовані середовища, культивували при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ протягом 24 годин та підраховували КУО.

Основними параметрами моделі ШКТ були: рН 5,5; 7,0 на основі цитратно-фосфатного буферного розчину (ЦФБР); ферментативна компонента «Панзинорм» у концентрації 25мг/мл; досліджувані відповідні концентрації НЧМ; перемішування — 90 об/хв; температура культивування — $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$; час культивування — 3 години;. В цій моделі оцінювали параметр виживаності типових пробіотичних культур.

Об'єм інкубаційної проби — 10 мл. Засівна доза — 10^3 КУО/мл.

Після закінчення інкубування з кожної проби та контролю відбирали по $0,1\text{см}^3$ культуральної рідини і засівали на поверхню

МПА, рівномірно розподіляючи шпателем (за необхідності готували 10-кратні розведення). Культивували при 37°C протягом 18–24 годин та підраховували КУО/см³. Виживаність тестових мікроорганізмів у порівнянні з початковою кількістю виражали у процентах, розраховуючи за формулою:

$$\% \text{ виживаності} = 100 - (K_k - K_0) / K_k \times 100\%,$$

де K_k = кількість колоній, які вирости у контролі,

K_0 = кількість колоній — в досліді.

Експерименти здійснено в трьох повторях та в двох паралелях.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень щодо впливу наночастинок золота на типові тестові пробіотичні культури *in vitro* встановлено, що наночастинок золота з середнім розміром 20 та 30 нм у досліджених концентраціях справляли стимулюючий вплив на інтенсивність росту культур *Escherichia coli* M-17 та *Bifidobacterium bifidum*. При цьому для клітин бактерій пробіотичного штаму *Escherichia coli* M-17 спостерігали стимулюючий вплив наночастинок золота розмірами 20 та 30 нм у всіх досліджених концентраціях, а для бактерій *Bifidobacterium bifidum* стимулюючий вплив мав місце лише для наночастинок золота в максимально використаних концентраціях. Інтенсивність росту бактерій *Lactobacillus acidophilus* 317/402 не зазнавала суттєвих змін в присутності наночастинок золота обох розмірів (табл.1).

У випадку тестування наночастинок срібла щодо їх впливу на пробіотичні культури *Lactobacillus acidophilus* 317/402, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* M-17 *in vitro* показано, що наночастинок з середнім роз-

Таблиця 1

Характеристики стану пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* 317/402, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* M-17 за дії наночастинок золота та срібла в моделі *in vitro*.

Пробіотична культура	Кількість КУО/мл за дії наночастинок золота розміром 20 нм		Кількість КУО/мл за дії наночастинок золота розміром 30 нм		Кількість КУО/мл за дії наночастинок срібла розміром 30 нм		Кількість КУО/мл без дії наночастинок металів
	3 мкг/мл	11·10 ⁻⁵ мкг/мл	3,5 мкг/мл	14·10 ⁻⁵ мкг/мл	21,5 мкг/мл	86,0·10 ⁻⁵ мкг/мл	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402	1,6 · 10 ⁶	1,2 · 10 ⁶	2,8 · 10 ⁶	1,9 · 10 ⁶	2	2,6 · 10 ⁶	3,4 · 10 ⁶
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4,2 · 10 ⁶	4,0·10 ⁶	4,2 · 10 ⁶	3,6 · 10 ⁶	6	3,9 · 10 ⁶	4,1 · 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> M-17	3,2 · 10 ⁶	2,2·10 ⁶	2,8 · 10 ⁶	2,7 · 10 ⁶	4	2,6 · 10 ⁶	2,1 · 10 ⁶

міром 30 нм при концентрації 21,5 мкг/мл за металом інгібували ріст усіх досліджених пробіотичних культур (бактерицидний ефект). Проте при концентрації $86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл наночастинки срібла цього розміру стимулювали ріст бактерій штаму *Escherichia coli* M-17 (табл.1).

Оскільки метою роботи було вивчення біосумісності наночастинок золота та срібла, доцільним виявилось тестування їх у моделі, яка б імітувала фізіолого-біохімічні параметри процесу травлення у верхньому відділі тонкого кишечника людини.

Як видно з таблиці 2 при рН 5,5 спостерігався високий рівень виживаності (67-73 %) для бактерій пробіотичної культури *Lactobacillus acidophilus* 317/402 в присутності наночастинок золота розмірами 20 та 30 нм. % виживаності бактерій штаму *Escherichia coli* M-17 в аналогічних умовах був низьким і складав для наночастинок 20 нм — 50,25 % відповідно для концентрацій 3 мкг/мл та $11 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл та 6 % і, 25 % — відповідно для наночастинок золота 30 нм в концентраціях 3,5 та $14 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл.

Особливої уваги заслуговують результати впливу наночастинок золота розмірів 20 і 30 нм всіх досліджених концентрацій на клітини штаму *Bifidobacterium bifidum*: процент

виживаності більш ніж на 2 порядки перевищував 100 %.

При використанні моделі з рН 7,0 виявлено стимулюючий вплив наночастинок золота обох розмірів на бактерії пробіотичного штаму *Escherichia coli* M-17 (показники виживаності 114–122 %). Також відзначено високий рівень виживаності (до 70 %) для бактерій *Bifidobacterium bifidum* за дії наночастинок золота розміром 20 нм в концентрації $11 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл та наночастинок 30 нм у всіх використаних концентраціях. Встановлений високий рівень виживаності бактерій пробіотичного штаму *Lactobacillus acidophilus* 317/402 в присутності наночастинок золота 30 нм в концентраціях 3,5 і $14 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл (60 і 64 % відповідно), порівняно з низькими показниками виживаності клітин цього штаму (36 %, 31 %) за дії наночастинок золота розміром 20 нм для концентрацій 3 та $11 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл відповідно, свідчить про більш високий рівень біологічної сумісності наночастинок золота розміром 30 нм.

Щодо оцінки дії наночастинок срібла розміром 30 нм, слід зазначити, що при концентрації 21,5 мкг/мл має місце бактерицидний ефект по відношенню до всіх вивчених пробіотичних штамів при обох модельних значеннях рН. Наночастинки срібла при рН 7,0

Таблиця 2

Характеристики виживаності пробіотичних культур *Lactobacillus acidophilus* 317/402, *Bifidobacterium bifidum*, *Escherichia coli* M-17 за дії наночастинок золота та срібла в моделі, що імітує процеси травлення ШКТ

Пробіотична культура	% виживаності пробіотичної культури за дії наночастинок золота розміром 20 нм		% виживаності пробіотичної культури за дії наночастинок золота розміром 30 нм		% виживаності пробіотичної культури за дії наночастинок срібла розміром 30 нм	
	3 мкг/мл	$11 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	3,5 мкг/мл	$14 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл	21,5 мкг/мл	$86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл
рН=5,5						
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402	73	67	67	78	6	78
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2323	700	1440	198	2	84
<i>Escherichia coli</i> M-17	50	25	6	25	1	24
рН=7,0						
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402	36	31	60	64	0	59
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	48	65	70	70	1	148
<i>Escherichia coli</i> M-17	122	114	122	83	1	83

в концентрації $86,0 \cdot 10^{-5}$ мкг/мл виявляли стимулюючий вплив на клітини штаму *Bifidobacterium bifidum* («%виживаності» — 148 %).

Таким чином, виконаний комплекс експериментальних робіт щодо оцінки стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини за дії наночастинок золота і срібла, дає змогу сформулювати наступні висновки:

1). Наночастинки золота розміром 20 та 30 нм є біосумісними та біобезпечними для типових представників нормофлори шлунково-кишкового тракту людини.

2). Виходячи з рівня стимулювання ростових процесів типових пробіотичних штамів, наночастинки золота розміром 30 нм мають вищий рівень біосумісності, ніж наночастинки 20 нм.

3) Наночастинки срібла розміром 30 нм є біосумісними в концентраціях порядку 10^{-5} мкг/мл по металу.

4). Отримані результати щодо біосумісності наночастинок золота та срібла цілком співпадають з результатами по вивченню їх генотоксичності, як системного біомаркера біобезпечності [1].

5). Представлений спосіб оцінки стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини при дії наночастинок металів є адекватним та високопрогностичним при інтегральному оцінюванні біобезпечності та біосумісності наноматеріалів.

Перспективи подальших досліджень. Представлені експериментальні матеріали є частиною надзвичайно важливої роботи по розробці та гармонізації системи оцінки біобезпеки та біосумісності наноматеріалів. Така система буде включати ключові фізіолого-біохімічні параметри живого організму, які є чутливими до потенційно небезпечної дії наноматеріалів. Планується ви-

вчення біосумісності та біобезпечності більш широкого спектру пріоритетних наноматеріалів з метою створення банку перспективних наноматеріалів для потреб медицини, ветеринарії, індустрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дибкова С. М. Визначення ушкоджень ДНК наночастинок металів, перспективних для біотехнології/С. М. Дибкова, М. Є. Романько, Т. Г. Грузіна [та ін.]//Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 3. — С.80–85.
2. Данилович Г. В. Вплив іонного та колоїдного золота на АТФ-гідролазні ферментні системи в мембрані мікроорганізмів *Bacillus* sp B4253 та *Bacillus* sp B4851/Г. В. Данилович, Т. Г. Грузіна, З. Р. Ульберг [та ін.]//Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 4. — С. 46–51.
3. Вплив металів-мікроелементів на функціональний стан бактерій-пробіотів/Л. С. Резніченко, Т. Г. Грузіна, В. В. Вембер [та ін.]//Укр. біохім. журн. — 2008. — Т. 80, № 1. — С. 96–101.
4. Коллоидные металлы как перспективные компоненты для создания комплексных металлосодержащих пробиотиков/Т. Г. Грузина, В. В. Вембер, С. А. Немиро [и др.]//Доповіді НАН України, Сер. Біологія. — 2004. - № 3. — С. 154–158.
5. Методические разработки к практикуму по коллоидной химии/под ред. А. В. Перцова. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 132с.
6. Розенфельд Л. Г. Нанотехнології наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику/Л. Г. Розенфельд, В. Ф. Москаленко, І. С. Чекман., [та ін.]//Український медичний часопис. — 2008. — № 5. — С.63–68.
7. Патент України на корисну модель МПК (2006): А61К 35/66 Спосіб підвищення фізіологічної активності ентеробактерій *Escherichia i*/або *Enterococcus*/З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузіна, С. А. Немиро [та ін.]//Заявл. 04.12.2007; Опубл. 25.11.2008, Бюл. № 22. — 4 с.
8. Чекман І. С. Біохімічний мінімум. Наночастинки: властивості та перспективи застосування/І. С. Чекман//Укр. біохім. Журн. — 2009 — Т. 81, № 1. — с.122–129.
9. Caruthers S. D. Nanotechnological applications in medicine/S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza//Current Opinion Biotechnology. — 2007. — Vol 18, No 1. — P.26–30.
10. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance/C. Medina, M. J. Santos-Martinez, A. Radomski [et al.]//British Journal of Pharmacology. — 2007. — Vol.150. — P.552–558.

УДК 579.864.1:577.151

ОЦІНКА СТАНУ МІКРОФЛОРИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЛЮДИНИ ПРИ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА І СРІБЛА

Дибкова С. М.

Резюме. Шляхом оцінки стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини вивчено біосумісність наночастинок золота та срібла, перспективних в біотехнології. Показано, що такий спосіб оцінки біосумісності наночастинок металів є адекватним та високопрогностичним при інтегральному оцінюванні біобезпечності та біосумісності наноматеріалів. Наночастинки золота розміром 20 та 30 нм є біосумісними та біобезпечними для типових штамів-пробіотів — представників нормофлори шлунково-кишкового тракту людини. Наночастинки золота розміром 30 нм мають вищий рівень біосумісності, ніж наночастинки 20 нм. Наночастинки срібла розміром 30 нм є біосумісними в концентраціях порядку 10^{-5} мкг/мл за металом.

Ключові слова: наночастинки золота, наночастинки срібла, біосумісність, біобезпечність, штами-пробіоти.

УДК 579.864.1:577.151

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

Дыбкова С. Н.

Резюме. Изучена биосовместимость перспективных в биотехнологии, наночастиц золота и серебра путем оценки состояния микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Показано, что такой способ оценки биосовместимости наночастиц металлов является адекватным и высокопрогностичным при интегральной оценке биобезопасности и биосовместимости наноматериалов. Наночастицы золота размером 20 и 30 нм биосовместимы и биобезопасны для типичных штаммов-пробионтов — представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Наночастицы золота размером 30 нм имеют более высокий уровень биосовместимости, чем наночастицы 20 нм. Наночастицы серебра размером 30 нм биосовместимы в концентрациях порядка 10^{-5} мкг/мл по металлу.

Ключевые слова: наночастицы золота, наночастицы серебра, биосовместимость, биобезопасность, штаммы-пробионты.

UDC 579.864.1:577.151

RISK ASSESSMENT of MICROFLORA of GASTROINTESTINAL TRACT at GOLG and SILVER NANOPARTICLES EXPOSE

Dybko S. M.

Summary. Biocompatibility of gold and silver nanoparticles perspective for biotechnology was studied by assessing the microflora of the human gastrointestinal tract. It has been shown that the method of estimates metal nanoparticles biocompatibility is appropriate and highly prognostic in the integral assessment of nanomaterials biocompatibility and biosafety. Gold nanoparticles of 20 and 30 nm are biocompatible and biosafe for typical probiotics strains. Gold nanoparticles with size 30 nm have a higher level biocompatibility than 20 nm nanoparticles. Silver nanoparticles with size 30 nm is biocompatible in order concentrations 10^{-5} mg/ml of metal.

Key words: gold nanoparticles, silver nanoparticles, biocompatibility, biosafety, probiotics strains.

Стаття надійшла 16.07.2010 р.

УДК 616.093–098:615.31

Н. М. Поліщук, І. Ю. Кучма *, В. В. Казмірчук *, О. М. Щербак *

ДОСЛІДЖЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ТА ШВИДКОСТІ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ШТАМІВ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ДО ПОХІДНИХ ПІРИДО[4_r,3_r:5,6]ПІРАНО[2,3-*D*]ПІРИМІДИНІВ

Запорізька обласна санітарно-епідеміологічна станція (м. Запоріжжя)
*Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України (м. Харків)

Дана робота є фрагментом наукової теми «Диференційна діагностика та прогнозування наслідків захворювань шлунково-кишкового тракту (інфекційного та неінфекційного генезу), що супроводжуються синдромом дисбактеріозу кишечника», № державної реєстрації 0105U001111.

Вступ. Боротьба з інфекційними захворюваннями впродовж багатьох років залишається однією з найважливіших проблем медичної науки і практики. Значну частину інфекційної патології складають захворювання, що викликаються *Y. enterocolitica* [4]. Поліморфізм клінічних проявів, збільшення кількості латентних форм, хронічний перебіг хвороби та несприятливі наслідки, примушують дивитися на ієрсиніоз як на серйозну проблему для лікарів і пацієнтів. Важливим аспектом в лікуванні ієрсиніозів є попередження розвитку рецидивів та ускладнень захворювання, які часто пов'язані з неефек-

тивною антибактеріальною терапією [1,7]. Останнім часом, в практиці для лікування кишкового ієрсиніозу використовуються фторхінолони, аміноглікозиди, цефалоспори́ни III покоління, хлорамфенікол [7,8]. Але значна частота виникнення незадовільних результатів антибактеріальної терапії, навіть, при використанні даних антибіотиків, потребує пошуку нових речовин, володіючих протиієрсиніозною активністю.

На даний час добре відомі сполуки піримідинового циклу із широким спектром фармакологічної дії. Серед даних сполук високою протимікробною активністю виділяється триметоприм, який пригнічує дигідрофолатредуктазу бактеріальної клітини, порушуючи тим самим перетворення бактеріального дигідрофолату в тетрагідрофолат [2,5]. Безумовною перевагою похідних піримідину являється їх низька токсичність. Широкий спектр фармакологічних властивостей пре-