

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Саратовский научно-исследовательский институт

травматологии и ортопедии»

На правах рукописи

ШУЛЬГИНА ТАТЬЯНА АНДРЕЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ
НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МЕДИ
И ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

кандидат биологических наук

Нечаева Ольга Викторовна

Саратов – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 Влияние антибактериальных средств на полирезистентные штаммы микроорганизмов.....	12
1.1 Антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов.....	12
1.1.1 Механизмы формирования антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.....	12
1.1.2 Условия развития антибиотикорезистентности микроорганизмов.....	14
1.2 Альтернативные антимикробные препараты.....	15
1.2.1 Антибактериальные свойства металлов и их наночастиц.....	16
1.3 Перспективные направления использования наночастиц металлов в медико-биологической практике.....	28
1.3.1 Проблемы заживления осложненных гнойных ран.....	28
1.3.2 Использование наночастиц металлов для антимикробной фотодинамической терапии.....	30
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
Глава 2 Объект, материалы и методы.....	34
2.1 Экспериментальные модели.....	34
2.2 Химические соединения, использованные в работе.....	36
2.3 Методы микробиологических исследований.....	38
2.4 Определение токсикологических характеристик водных дисперсий наночастиц серебра и меди.....	40
2.5 Методы изучения действия наночастиц металлов в составе водных дисперсий на процесс регенерации экспериментальных гнойных ран.....	41
2.6 Статистические методы.....	43
Глава 3 Изучение биологической активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов	46
3.1 Анализ устойчивости клинических штаммов <i>S. aureus</i> и <i>E. coli</i> к антибактериальным препаратам.....	46
3.2 Изучение антимикробной активности водных и водных диализованных растворов наночастиц серебра и меди.....	49
3.2.1 Влияние водных и водных диализованных растворов наночастиц металлов и стабилизатора на выживаемость стандартных штаммов бактерий.....	50
3.2.2 Влияние водных и водных диализованных растворов наночастиц металлов и стабилизатора на выживаемость клинических штаммов бактерий.....	54

3.3	Влияние водных растворов наночастиц металлов на адгезивную активность грамположительных и грамотрицательных бактерий.....	63
3.4	Изучение стабильности водных и водных диализованных растворов наночастиц металлов в процессе хранения.....	65
3.5	Определение острой токсичности водных и водных диализованных растворов наночастиц металлов на биотест-объекте <i>Daphnia magna</i> Straus.....	69
Глава 4	Изучение антимикробной фотодинамической активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов.....	72
Глава 5	Влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов на процесс регенерации экспериментальной гнойной раны.....	77
	Заключение.....	84
	Выводы.....	90
	Список сокращений и условных обозначений.....	91
	Список литературы.....	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Развитие резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам является сложной и многогранной проблемой прикладной микробиологии и ветеринарии. В последнее время особое внимание уделяется изучению закономерностей развития лекарственной устойчивости клинических штаммов микроорганизмов к применяющимся антибиотикам и химиотерапевтическим средствам и возможных путей её преодоления [67, 71, 100, 101, 115, 168, 171, 195].

Установлено, что скорость развития и степень выраженности антибиотикорезистентности зависят как от вида антибиотика, так и от вида микроорганизма [69, 90, 176, 214]. Формирование резистентности микроорганизмов обусловлено не только генетическими и биохимическими механизмами, но и социально-экономическими аспектами. Полностью предотвратить формирование и распространение резистентности микроорганизмов невозможно, поскольку этот феномен является их способностью адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Однако можно добиться снижения скорости распространения резистентности и обеспечить длительное сохранение эффективности существующих антимикробных средств при соблюдении принципов рациональной антибиотикотерапии [18, 109, 110, 119, 131, 137, 181].

В отечественной и зарубежной литературе имеется значительное количество публикаций, посвященных разработке перспективных подходов к преодолению резистентности микроорганизмов за счёт вновь разработанных и синтезированных альтернативных средств с высокой антимикробной активностью – препаратов на основе липосом, нанокристаллов и нанопорошков различных природных и искусственных соединений [1, 6, 106, 161, 153, 154, 159].

В последние годы с развитием современных технологий синтеза наноматериалов возник интерес к изучению свойств металлов в ультрадисперсном диапазоне в виде порошков, растворов и суспензий [8, 61, 86,

184, 189]. Наряду с этим появляется все больше данных о том, что в борьбе с антибиотикорезистентностью микроорганизмов важную роль играют наночастицы металлов, стабилизированные известными поверхностно-активными веществами в составе водных дисперсий, которые препятствуют процессу их агрегации в течение нескольких месяцев [75, 95, 138, 160, 167, 169, 173, 190, 211].

В связи с этим наиболее перспективными в использовании становятся водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов, полученные с помощью биохимического синтеза в обратных мицеллах (водный раствор соли металла/поверхностно-активное вещество/неполярный растворитель). При этом реакции восстановления и формирования наночастиц протекают в водном ядре мицеллы, образованной молекулами поверхностно-активного вещества, с помощью природных биологически активных веществ – растительных пигментов из группы флавоноидов, что обеспечивает длительную стабильность наночастиц и делает этот процесс максимально безопасным для окружающей среды [53, 54, 55, 56, 107].

В связи с тем, что возбудителями ряда гнойно-воспалительных заболеваний являются бактерии родов *Staphylococcus* и *Escherichia* [52, 66, 81, 92, 125, 212], представляло интерес исследовать антимикробные свойства водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди в отношении этих микроорганизмов.

Степень разработанности проблемы

Исследованиями ряда авторов показана антимикробная активность наночастиц металлов [13, 63, 134, 178, 199].

Использование металлических наночастиц для фотодинамической терапии представлено в работах следующих авторов [9, 34, 40, 49, 70, 111, 120, 144, 149, 213].

Действие наночастиц металлов на экспериментальные гнойные раны отмечено в исследованиях [1, 14, 16, 20, 28, 59, 80, 96, 126, 142, 201]. Во всех указанных работах описаны экспериментальные исследования по изучению антимикробных свойств металлических наночастиц, стабилизированных

антибактериальными поверхностно-активными веществами (поливинилпирролидоном, мирамистином).

Исследования по изучению влияния наночастиц серебра в составе водных дисперсий, полученных биохимическим синтезом, на референс-штаммы условно-патогенных бактерий приведены в работах Егоровой Е.М. и соавт. [55, 56, 151]. Однако для обоснования практического использования в медико-биологической и ветеринарной практике необходимо проведение детального исследования и подтверждения действия этих наночастиц серебра и меди, на клинические штаммы возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний с учетом их внутривидового разнообразия.

В связи с актуальностью изложенных выше вопросов **целью исследования** явилось изучение биологической активности водных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, на клинические штаммы возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и обоснование возможности их использования в качестве антимикробных препаратов.

Для реализации поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Изучить антибактериальную активность водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, в отношении стандартных и клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

2. Провести оценку сохранения размерности наночастиц серебра и меди в составе водных и водных диализованных дисперсий, полученных биохимическим синтезом, в процессе хранения в течение 24 месяцев.

3. Установить влияние водных дисперсий металлических наночастиц на адгезивные свойства условно-патогенных микроорганизмов.

4. Провести исследование действия водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, на биотест-объект *Daphnia magna* Straus.

5. Исследовать антимикробную фотодинамическую активность водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов.

6. Изучить эффективность использования водных дисперсий наночастиц серебра и меди при санации экспериментальных гнойных ран.

Научная новизна. Впервые исследована антимикробная активность водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, в отношении клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* и установлена ее зависимость от концентрации стабилизатора в составе водных дисперсий наночастиц этих металлов.

Показано влияние водных и водных диализованных дисперсий на снижение адгезивной активности как стандартных, так и клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Проведена оценка острой токсичности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов на стандартном биотест-объекте *Daphnia magna* Straus, что позволило отнести образец водной диализованной дисперсии наночастиц серебра в диапазоне концентраций от 1 % до 0,125 % к нетоксичным соединениям.

Установлено, что сочетанное воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) и водных дисперсий наночастиц серебра и меди приводит к эффективному ингибированию роста стандартных и клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, что позволяет рассматривать эти препараты в качестве перспективных фотосенсибилизаторов для усиления эффекта действия синего излучения на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

Исследовано влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов, полученных биохимическим синтезом, на процесс заживления экспериментальных гнойных ран; показана высокая эффективность водной дисперсии наночастиц серебра в очищении раневой поверхности от гнойного экссудата и сокращение срока заживления ран.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обобщены и систематизированы данные о биологической активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов, полученных биохимическим синтезом, и их зависимости от содержания стабилизатора. Результаты

проведенных исследований являются основанием для выбора наиболее оптимальных комбинаций металлических наночастиц и стабилизаторов с низкими показателями токсичности при создании высокоэффективных препаратов для ветеринарной практики.

Разработана база данных «Анализ действия водных дисперсий наночастиц металлов на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*» (свидетельство о гос. регистрации № 2013620158 по заявке № 2012621425, приор. от 12.12.12 г., опубл. 09.01.13 г., Бюл. № 1), в которой показано антимикробное действие водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов серебра и меди и стабилизатора диоктисульфосукцината натрия. Функциональные возможности базы данных позволят создать выборку результатов по заданным критериям. Результаты такой обработки могут быть полезны при анализе концентраций опытных образцов препаратов для микроорганизмов другой видовой принадлежности.

Полученные результаты открывают перспективы использования водных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом, в качестве активных компонентов для создания жидких антисептических и дезинфицирующих средств для медико-биологической и ветеринарной практики.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на основании договора о научно-техническом сотрудничестве, предметом которого явилась организация и проведение научно-исследовательских и экспериментальных работ в области микробиологии с использованием наноматериалов, предоставляемых фирмой «Наномет», а также в рамках выполнения плана НИР ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России.

Методология исследований соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явилось изучение биологической активности водных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных биохимическим синтезом на клинические штаммы возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний и обоснование возможности их использования в качестве антимикробных препаратов. Проведен анализ литературных источников, комплексный анализ

результатов микробиологических, биофизических и токсикологических исследований. Осуществлены мониторинг основных параметров, аналитическая и статистическая обработка полученных результатов; представлены научное обоснование и выводы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Водные дисперсии наночастиц серебра и меди, полученные биохимическим синтезом, характеризуются высокой антимикробной активностью в отношении клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

2. Водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди снижают уровень адгезивной активности как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, тем самым нарушая механизмы начального этапа взаимодействия микробной клетки с клетками макроорганизма.

3. Водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди характеризуются низкими показателями токсичности по сравнению с водными дисперсиями; уровень токсичности зависит от концентрации стабилизатора.

4. Высокая фотодинамическая активность водной диализованной дисперсии серебра, позволяет рассматривать её в качестве перспективного фотосенсибилизатора.

5. Использование водной диализованной дисперсии наночастиц серебра при санации экспериментальных гнойных ран позволило сократить сроки их заживления.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность и обоснованность результатов и выводов подтверждается применением методов биологических исследований, соответствующих целям и задачам выполненной работы, проведением экспериментов на сертифицированном оборудовании, использованием статистического анализа с помощью программного обеспечения. В диссертационной работе приведено сравнение авторских данных с данными, опубликованными ранее в мировой научной литературе по исследуемой тематике.

Основные положения работы доложены и/или представлены на: интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2012); II Международной научно-практической конференции «Современная наука: тенденции развития: материалы» (Краснодар, 2012); научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы травматологии, ортопедии, нейрохирургии и вертебрологии» (Саратов, 2012); 14-м заседании Саратовского отделения Межрегиональной общественной организации «Ассоциация травматологов-ортопедов» (Саратов, 2012); Международной научной конференции «Стратегии естественно-научного образования» (Испания, 2012); Международной научной конференции «Фундаментальные исследования» (Хорватия, 2012); Всероссийской научно-практической конференции «Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии» (Саратов, 2013), Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014).

Работа доложена и обсуждена на заседаниях учёного совета ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России в 2012-2014 гг.

Внедрение в практику

Материалы диссертации используются в учебном процессе (лекции и практические занятия) кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского»; в работе отдела функциональных и клинико-экспериментальных исследований ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России.

Основные результаты исследований изложены в 16 печатных работах, в том числе в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 14 рисунками

и 16 таблицами. Библиографический список содержит 215 литературных источника, из них 133 отечественных и 82 зарубежных.

Глава 1 Влияние антибактериальных средств на полирезистентные штаммы микроорганизмов

1.1 Антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов

1.1.1 Механизмы формирования антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов

На протяжении последних лет отмечается значительный рост устойчивости возбудителей инфекционных процессов к различным классам антибактериальных препаратов (β -лактамам, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, линкосамидам, гликопептидам, амфениколам, рифамицинам, противогрибковым и противоопухолевым средствам) [115, 168, 179, 212]. Резистентность к антибиотикам является естественным биологическим ответом микроорганизмов, формирующимся в результате естественного отбора и способствующим выживанию и размножению вида [100, 128]. Кроме того, антибиотикорезистентные штаммы всё чаще формируют микробные ассоциации, состоящие в основном из стафилококков и отдельных представители семейства *Enterobacteriaceae* (кишечная палочка, протей и др.) [3, 30].

Развитие устойчивости микробов к антибиотикам обусловлено общебиологическим законами, согласно которым, сопротивляясь вредным воздействиям, микробные клетки вырабатывают новые защитные механизмы. Особенно часто приобретение устойчивости происходит тогда, когда микроорганизмы длительно подвергаются действию низких концентраций антибиотиков. Резистентные штаммы возникают в результате селекции, адаптации и мутации. Немаловажную роль в ускорении формирования этих штаммов играет концентрация антибиотиков [84].

Увеличение устойчивости к антибактериальным препаратам может определяться разными причинами, среди которых:

1. Изменение проницаемости клеточной оболочки бактерий для антибактериальных препаратов. У грамотрицательных бактерий наружная часть

клеточной стенки представлена липидным бислоем, поэтому она менее проницаема и служит надежным барьером для многих антимикробных средств. Деструкция бета-лактамовых антибиотиков осуществляется в периплазматическом пространстве, поэтому их уровень резистентности зависит от скорости, с которой бета-лактамазы проникают в периплазматическое пространство, и скорости осуществляемого ферментами гидролиза. Такие бактерии обычно синтезируют меньшее количество фермента. У грамположительных бактерий периплазматическое пространство отсутствует, поэтому уровень антибиотикорезистентности будет зависеть от специфичности фермента и его количества, которое может быть экспрессировано. Бета-лактамазы таких бактерий, как правило, имеют высокий аффинитет к бета-лактамовым антибиотикам [51, 132, 133].

2. Изменение свойств мишеней, которые становятся невосприимчивыми к бактерицидному действию какого-либо препарата. Поэтому препарат не взаимодействует с мишенью и не повреждает функцию жизненно важного процесса или фермента в клетке [4, 39].

3. Активный выброс препарата из микробной клетки, который осуществляется специфическими ферментными системами, выводящими из нее антимикробный препарат [19, 98].

4. Образование микробной клеткой энзимов (бета-лактамаз), которые модифицируют химическую структуру лекарственных средств до потери ими антимикробной активности. Эта причина является самым распространенным механизмом резистентности, так как бета-лактамазы могут раскрывать бета-лактамовое кольцо препаратов, содержащих эту структуру, причем наибольшую угрозу представляют β -лактамазы расширенного спектра [24, 87, 109, 110, 137].

1.1.2 Условия развития антибиотикорезистентности микроорганизмов

Развитию моно- и полирезистентности микроорганизмов способствует несоблюдение принципов рациональной антибиотикотерапии при лечении инфекционных заболеваний [7, 29, 35, 46, 47, 71, 102, 109, 119, 147, 155, 171]:

- необоснованное назначение антибактериальных средств, поскольку показанием для назначения антибактериального препарата является документированная или предполагаемая бактериальная инфекция [7, 35];

- ошибки в выборе антибактериального препарата, который должен выбираться с учетом основных критериев: спектра антимикробной активности препарата *in vitro*, регионального уровня резистентности возбудителей, доказанной эффективности в контролируемых клинических исследованиях [71, 147];

- ошибки в выборе режима дозирования антибактериального препарата: недостаточная или избыточная доза назначенного препарата, а также неправильный выбор интервала между введениями [29];

- ошибки комбинированного назначения антибиотиков: несмотря на то, что приоритет остается за монотерапией, достаточно часто назначается комбинированная антибактериальная терапия, рациональность которой сомнительна [46, 47, 155];

- ошибки, связанные с длительностью антибактериальной терапии: недостаточное понимание цели самой антибактериальной терапии, направленной на подавление микробной агрессии [102].

Антибиотикорезистентность имеет социально-экономическое значение, так как инфекционно-воспалительный процесс, вызванный резистентными штаммами, отличается длительным течением и увеличением сроков нахождения в стационаре. При этом возникает необходимость в выборе более дорогих и не всегда доступных лекарственных средств. Все это увеличивает прямые и

непрямые экономические затраты, а также повышает риск распространения резистентных штаммов среди населения [101, 179, 202].

Знание основных позиций антибиотикорезистентности и неудачи проводимой в клинической практике антибактериальной терапии являются определяющими в поиске и разработке новых лекарственных препаратов и средств для подавления инфекционно-воспалительных процессов (Декларация по борьбе с антимикробной резистентностью, 2000).

В настоящее время апробирован и получил разрешение для клинического применения первый цефалоспорин V поколения с анти-MRSA-активностью (цефтобипрол) [139, 145, 194]. Учёные бьют тревогу по поводу все возрастающих затрат на разработку, синтез и внедрение новых антибиотиков. Средняя стоимость разработки инновационного лекарственного препарата в мире составляет в среднем от 802 млн. долларов США для малых молекул до 1,318 млрд. долларов США для биопрепаратов. Разработка зарегистрированного препарата занимает в среднем 8 лет и обходится компании от 400 до 800 миллионов долларов США (Глобальная стратегия по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам, 2001) [173, 198].

1.2 Альтернативные антимикробные препараты

Для борьбы с полирезистентными штаммами микроорганизмов, а также с целью предотвращения их распространения во всем мире идет активный поиск средств органического и неорганического происхождения с высокой биологической активностью, которые могли бы успешно конкурировать с антибиотиками и химиотерапевтическими препаратами по своим антибактериальным свойствам. За последнее десятилетие в качестве антимикробных агентов испытываются различные классы соединений, особенно перспективными считаются материалы наноразмерных величин [5, 6, 36, 37, 38].

Наноматериалы, как правило, легко образуют комплексные соединения с другими веществами, в том числе органической природы, что связано с их высокой химической активностью. Образуемые комплексы обладают новыми свойствами. Так, наночастицы могут связываться с нуклеиновыми кислотами, белками, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органеллы, изменяя функции биоструктур [77, 85, 114].

Особого внимания заслуживают металлы, в частности серебро и медь, которые исторически известны как средства, обладающие антибактериальным эффектом [22, 23, 54, 55, 56, 65, 78, 156, 191].

1.2.1 Антибактериальные свойства металлов и их наночастиц

С появлением технологий получения материалов с наноразмерными величинами возник интерес к изучению свойств металлов в ультрадисперсном диапазоне. Это связано с тем, что наноструктурные материалы обладают «квантовыми размерными эффектами» [8].

На современном этапе осуществляется разработка нанолекарств, липосом, нанокристаллов, нанопорошков, суспензий и других наноматериалов для использования в практической медицине и ветеринарии [6, 41, 57, 153, 161, 164, 177, 207].

К наноматериалам относят объекты, созданные с использованием наночастиц и обладающие новыми свойствами. Размерность наночастиц составляет 100 нм и меньше.

Согласно номенклатуре Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC), рекомендации VII Международной конференции по нанотехнологиям (Висбаден, 2004), выделяют следующие категории наноматериалов:

– нанопористые структуры – нанофильтрационные полимерные мембраны;

- наночастицы – изолированные ультрадисперсные объекты;
- нанотрубки – тубулярная наноструктура;
- нанодисперсии – коллоидные растворы наночастиц в жидком растворителе (жидкость, содержащая частицы и агрегаты частиц с размером 0,1-100 нм);
- наноструктурированные поверхности и пленки – организованные наносистемы, в которых наноразмер проявляется только в одном измерении, а два других могут обладать макроразмерами;
- нанокристаллы – отдельный однородный кристалл, имеющий непрерывную кристаллическую решётку;
- нанокластеры – объединение нескольких однородных элементов, которое может рассматриваться как самостоятельная единица, обладающая определенными свойствами.

Установлено, что при уменьшении размеров частиц от 100 до 10 нм наблюдаются сравнительно слабые изменения физико-химических свойств веществ, а в диапазоне от 10 до 1 нм – кардинальные, в частности, у металлов.

В биологической и медицинской литературе под наноструктурными материалами обычно подразумевают вполне конкретные и, прежде всего, искусственно созданные молекулярные конструкции. Их можно условно разделить на несколько классов: биологические и биогенные наночастицы (ферменты, молекулы ДНК и РНК, рибосомы, клеточные везикулы, вирусы); полимерные наночастицы (полимолочная и полигликолевая кислоты, полиэтиленгликоль, поликапрактон); дендримеры (полиамидамин и аминокислота лизин); углеродные наночастицы (нанотрубки и фуллерены); неорганические наночастицы (наночастицы золота, серебра, платины, титана, цинка, железа, оксида кремния); квантовые точки (полупроводниковые нанокристаллы); супермагнитные наночастицы (магнетит); полимерные мицеллы (переносчики гидрофобных лекарственных препаратов); липосомы; перфторуглеродные наночастицы (наночастицы, состоящие из жидкого

перфторуглеродного ядра, покрытые липидным монослоем) [41, 104, 106, 164, 177].

Наночастицы металлов (железа, меди, цинка, серебра, золота, титана размером 5-60 нм) могут применяться как отдельные средства, так и покрываться органическими соединениями: декстранами и фосфолипидами. В таком виде эти частицы ингибируют агрегацию и повышают стабильность коллоидных растворов [1].

В последнее время находят все более широкое применение переходные металлы, относящиеся к подгруппе d-металлов и имеющие в валентной зоне d-электроны. Группа переходных металлов имеет несколько подгрупп: подгруппа Fe (железо, кобальт, никель); подгруппа Cu (медь, серебро, золото); подгруппа Mn (марганец, технеций, рений); подгруппа Cr (хром, молибден, вольфрам); подгруппа Zn (цинк, кадмий, ртуть). Наиболее широко изучается влияние на биологические объекты железа, меди, серебра, золота и цинка. В медико-биологических исследованиях используются мелкодисперсные порошки металлов.

И.В. Бабушкина и соавт. [13] изучали действие наночастиц железа на штаммы *S. aureus*, выделенные от больных с гнойными осложнениями травматолого-ортопедического стационара. Установлено, что характер влияния наночастиц железа на рост клинических штаммов и выраженность антибактериального эффекта зависят от вида наночастиц, их концентрации, времени воздействия. Наночастицы железа в концентрации 0,1 мг/мл и 1 мг/мл вызывают снижение количества микробных клеток от 3 до 34%. В меньших концентрациях достоверного антибактериального эффекта не отмечается.

В работе S.A. Mahdy, Q.J. Raheed, P.T. Kalaichelvan [172] показано влияние наночастиц оксида железа на штаммы *E. coli* и *S. aureus*, которые выращивали при различных концентрациях наночастиц в течение 24 часов. Было установлено, что наночастицы FeO полностью подавляли рост бактерий при концентрации 60 мкг/мл.

Механизм действия наночастиц железа на бактериальную клетку связан с окислительным стрессом, который испытывает мембрана за счет проникновения частиц размером 10-80 нм. Выраженность антибактериального действия возрастает с уменьшением размера наночастиц [123, 140, 162, 166, 203]. Установлено, что наночастицы FeO и Fe₂O₃ инактивируют штаммы *E. coli* за счёт образования внутри клеток активных форм кислорода, которые повреждают клеточную мембрану, нарушая дыхательный цикл; при этом антибактериальная эффективность железа в данных соединениях проявляется при концентрациях более 0,1 mM [166].

Наночастицы золота проявляют антимикробный эффект в отношении тест-штаммов *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. cereus*, *V. vulnificus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Flexibacter* sp. и *K. pneumoniae* [182, 186]. Антибактериальную активность наночастиц золота связывают с повреждением целостности клеточной стенки микроорганизма и выходом внутриклеточного содержимого во внеклеточное пространство, а также связыванием наночастиц с ДНК бактерий, что приводит к ингибированию её транскрипции [183].

Выявлена антибактериальная активность высокодисперсного порошка цинка на штаммы *P. aeruginosa* в концентрациях 0,001-3 мг/мл при временных экспозициях 30-180 минут. Концентрации 0,01-0,001 мг/мл при экспозиции более одного часа не оказывали статистически достоверного изменения количества выросших микроорганизмов, а концентрации 1,0-3,0 мг/мл способствовали снижению количества колоний на 21-38% по сравнению с контролем [13, 14, 50]. Определенный интерес вызывают наноразмерные частицы оксида цинка, которые проявляют биологическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Антимикробная активность наночастиц оксида цинка изучалась на штаммах *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *C. jejuni* и *P. aeruginosa* с использованием диско-диффузионного метода. Результаты показали, что наночастицы оксида цинка имеют выраженную антимикробную активность против всех тестируемых патогенов. Антибактериальная активность возрастала с

увеличением концентрации наночастиц [152, 174, 193, 210]. Антибактериальные свойства наночастиц оксида цинка были исследованы в зависимости от концентрации частиц в отношении грамположительных бактерий *L. monocytogenes* как в жидкой, так и на твердой питательной среде. Обнаружено, что рост опытной культуры полностью ингибируется при концентрации наночастиц 90 мкг/мл [135].

Механизм проникновения наночастиц оксида цинка через мембрану клетки полностью не исследован. Экспериментальные данные показывают, что возможны изменения в морфологии мембраны – значительное увеличение ее проницаемости, в результате чего бактериальные клетки неспособны регулировать транспорт через плазматическую мембрану. Это приводит к гибели клеток. Также не исключено влияние наночастиц оксида цинка на репликацию клеточных белков [185, 206, 210].

Серебро обладает более выраженным антимикробным эффектом, чем пенициллин и другие антибиотики, а также вызывает подобное действие на антибиотикоустойчивые штаммы бактерий [199].

Микробиоцидное действие серебра универсально, так как направлено на повреждение клеточных структур бактерии [200]. Поскольку клетки млекопитающих имеют мембрану совершенно другого типа (не содержащую пептидогликанов), то они более устойчивы к воздействию серебра, что указывает на перспективность использования данного металла в качестве антибактериального средства.

В работе N.V. Ayala-Nunez et al. [134] показано антибактериальное действие наночастиц серебра различных размеров (10, 30-40 и 100 нм) на метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*. Авторами доказано, что чем меньше размер наночастиц, тем более выражена их антибактериальная активность.

В исследованиях S. Pal et al. [178] было проанализировано антибактериальное действие наночастиц серебра на штаммы *E. coli* в зависимости от формы наночастицы и показано, что наночастицы серебра с усеченной треугольной формой обладают более сильным бактерицидным эффектом по сравнению со сферической и палочковидной.

В отношении грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*S. aureus* и *B. subtilis*) микроорганизмов антибактериальный эффект возрастает с увеличением концентрации наночастиц серебра и времени их воздействия на исследуемый микроорганизм. Также показано, что более выраженный антимикробный эффект наблюдается в отношении грамотрицательных микроорганизмов [150, 165].

В исследовании Э.В. Малафеевой и соавт. [74] изучалась антибактериальная активность различных по концентрации коллоидных растворов наночастиц серебра (11 мг/л, 33 мг/л, 55 мг/л) на штаммы микроорганизмов, выделенных из экссудата гнойных ран и из отделяемого со слизистой носа. Растворы наночастиц серебра проявляли высокое антимикробное действие по отношению к грамотрицательной (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *Serratia*, *Enterobacter*) и грамположительной микрофлоре (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*). Коллоидные растворы наночастиц серебра также были высокоэффективны против грибов рода *Candida* и дрожжеподобных грибов. Выявленное бактерицидное действие оказалось дозозависимым.

В работе Б.С. Кибрика [63] приведены результаты экспериментальных исследований по влиянию наночастиц серебра на *M. tuberculosis*. Показано, что наночастицы серебра в комбинации с противотуберкулезным химиопрепаратом изониазидом, обеспечили подавление роста микобактерий в 76,4% случаев. Установлен дозозависимый эффект наночастиц серебра в составе нанокompозита.

Д.С. Афанасьева и Т.С. Дульцева [10] провели эксперимент по изучению влияния золей серебра, золота и меди в концентрациях 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 на *E. coli*. В отношении этого штамма наибольшую антимикробную активность (бактерицидный эффект в разведении 1:80) показали ионы серебра, в то время как для ионов золота бактерицидный эффект наблюдался в разведении 1:20. Ионы меди не обладали противомикробным действием. В составе различных золей наночастицы выбранных металлов (серебро и золото) в концентрации 1:10 также обладали различным действием на микроорганизмы. Наибольшая

антибактериальная активность наблюдалась при действии боргидридного золь серебра: бактерицидный эффект по отношению к *E. coli*, *S. aureus* и *P. vulgaris*, бактериостатический – по отношению к *K. pneumonia* и *P. aeruginosa*. Цитратный золь серебра имел выраженную бактерицидную активность по отношению к *E. coli* и бактериостатическую – к *P. vulgaris*. Цитратный золь золота не показал бактерицидной активности.

Данные, полученные Е.М. Егоровой [55, 151] на штаммах *E. coli* в водной среде, показывают, что при значительной начальной концентрации бактерий (3×10^8 кл/мл), при небольшом времени экспозиции (30 мин.) обеспечивается высокий уровень инактивации (90-100%) в широком диапазоне разведений исходного водного раствора наночастиц серебра (до 75 раз). Действие наночастиц на отдельные штаммы *E. coli* сравнивалось с действием ионов Ag^+ (введившихся в виде нитрата серебра) в соответствующих концентрациях. Было показано, что динамика инактивации бактерий более интенсивна под действием наночастиц, чем ионов серебра. Высокий уровень бактерицидной активности наночастиц при введении в водную среду был отмечен на музейных штаммах *E. coli* и *S. aureus*. Для двух последних видов была также определена нижняя граница концентрации наночастиц в водной среде (3-5 мкг/мл), при которой достигается 100% гибель бактерий.

Е.М. Егоровой также проводились экспериментальные исследования по изучению антибактериального действия водных растворов наночастиц серебра в диапазоне концентраций от 0,125% до 3% с использованием временных экспозиций 30 мин., 60 мин., 120 мин. и 24 часа на музейные штаммы *E. coli* и *S. aureus*. Опытные образцы добавляли непосредственно в микробную взвесь. Полученные данные показывают, что водный раствор наночастиц серебра в концентрациях от 0,75% до 3% и временной экспозиции 24 часа полностью подавляет рост бактериальных клеток [151].

Некоторые исследователи, объясняя механизм воздействия серебра на клетку, особое значение придают интрацеллюлярным физико-химическим процессам. В частности, окислению протоплазмы бактерий и ее разрушению

кислородом, растворенным в воде, причем серебру отводят роль катализатора [64, 143, 148].

Имеются данные, свидетельствующие об образовании комплексов нуклеиновых кислот с тяжелыми металлами, вследствие чего нарушается стабильность ДНК и, соответственно, жизнеспособность бактерий [141, 186].

Существует также мнение, что серебро не оказывает прямого воздействия на ДНК клеток, а действует косвенно, увеличивая количество внутриклеточных свободных радикалов, которые снижают концентрацию внутриклеточных активных соединений кислорода [116, 197]).

Также допускают, что одной из причин широкого противомикробного действия ионов серебра является взаимодействие с рибосомой и последующее ингибирование экспрессии ферментов и белков, необходимых для производства АТФ [208].

Таким образом, механизм действия серебра на микробную клетку заключается в том, что ионы серебра сорбируются клеточной оболочкой, которая выполняет защитную функцию. Клетка остается жизнеспособной, но при этом нарушаются некоторые ее функции, например, митотическая активность (бактериостатический эффект). Как только на поверхности микробной клетки сорбируется серебро, оно проникает внутрь клетки и ингибирует ферменты дыхательной цепи, а также разобщает процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в микробных клетках, в результате чего клетка гибнет (бактерицидный эффект) [124, 136, 197].

Изучение антимикробных свойств наночастиц меди разной дисперсности и степени окисленности отражено в трудах А.С. Рахметовой [94]. Антибактериальное действие наночастиц меди изучали на тест-культурах грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных бактерий (*S. albus*) на твердой питательной среде диффузионно-дисквым методом, оценивая биоцидный эффект по зоне задержки роста клеток вокруг дисков с нанесенными на них наночастицами меди. Установлено, что наночастицы меди проявляют более выраженное антибактериальное действие в отношении грамположительных

бактериальных клеток *S. albus* (на 18-45% больше) по сравнению с грамотрицательными клетками *E. coli*.

Экспериментальное исследование, проведенное И.А. Мамоновой [76], показало, что антибактериальная активность нанопорошков меди в отношении клинических штаммов *S. epidermidis* колеблется в широких пределах. При действии низкой концентрации (0,01 мг/мл) наступала 70% гибель микроорганизмов. Воздействие взвеси нанопорошка с концентрациями 0,04; 0,05 и 0,06 мг/мл приводило к практически полной гибели микроорганизмов, количество погибших клеток соответственно достигало 94, 97 и 98%.

В работах И.В. Бабушкиной и соавт. [13] показана антибактериальная активность наночастиц меди и железа в широком диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мг/мл на клинические штаммы *S. aureus*. При кратковременном воздействии (30 мин.) наблюдается уменьшение количества микробных клеток *S. aureus*, выросших на твердой питательной среде, на 97-100% по сравнению с контролем.

Проведено сравнительное изучение антибактериального действия наночастиц железа и сплава нанопорошков железа, цинка и меди на клинические штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*. Наночастицы железа в концентрации 10 мг/мл в течение 30 мин. инактивируют рост тест-штаммов на 25-30%, а сплав наночастиц металлов в той же концентрации и временной экспозиции приводит к уменьшению КОЕ у штаммов *P. aeruginosa* на 60-85%, у штаммов *E. coli* – на 80-90%. Выявлено более выраженное ингибирующее воздействие сплава наночастиц металлов на рост и биохимическую активность клинических штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* по сравнению с действием наночастиц конкретного металла. Авторы делают выводы о том, что степень ингибирования зависит от дозы ультрадисперсных порошков и вида микроорганизмов [12].

А.М. Белов и соавт. [17] в своей работе изучали действие сплава наночастиц меди, цинка и железа на штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*, выделенные от больных урологическими заболеваниями. Выраженность антибактериального эффекта определяли по числу выросших колоний микроорганизмов на чашках Петри с

различной концентрацией наночастиц металлов в суспензии. В результате исследования выявлена прямая зависимость «доза-эффект».

T. Theivasanthi и M. Alagar [204] пришли к выводу, что наночастицы меди, синтезированные различными методами, показывают разную по степени выраженности антимикробную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий.

В работах Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P. et al. [188] была исследована антимикробная активность наночастиц серебра и меди размером 3 и 9 нм в отношении грамположительных (*S.aureus*, *B. subtilis*) и грамотрицательных (*E.coli*) бактерий. Авторами установлено, что наночастицы серебра обладают более выраженным антимикробным действием на культуры *E. coli* и *S. aureus*, чем наночастицы меди. Наиболее чувствительными к воздействию наночастиц оказались штаммы *B. subtilis*, при этом наночастицы меди оказывали более сильное антимикробное действие по сравнению с наночастицами серебра.

В настоящее время рассматривается несколько механизмов, посредством которых медь оказывает антимикробное действие [72, 105, 180]:

- ингибирование и нарушение синтеза белка и нуклеиновых кислот (медь обладает способностью взаимодействовать с аминокислотами и SH-группами ферментов, активно участвующими в синтезе белка, что может нарушать этот процесс);

- снижение уровня восстановленных тиолов и глутатиона в клетках (глутатион относится к числу метаболитов, активно увеличивающихся при осмотическом стрессе; одна из функций глутатиона связана с удержанием ионов калия в цитоплазме через регуляцию калий-выходных каналов);

- изменение структурно-функциональных свойств и барьерных функций мембраны клетки: активные формы кислорода, образующиеся при взаимодействии ионов меди с бактериями в аэробных условиях, не принимают участия в индукции каналов проводимости в мембране (при взаимодействии ионов меди с бактериями в аэробных условиях образуются активные формы кислорода, которые блокируют каналы проводимости в мембране, что приводит к

нарушению барьерных свойств мембраны и окислительно-восстановительных процессов в примембранном пространстве).

Считают, что наночастицы металлов вызывают повреждения клеточных мембран, ингибируют транскрипцию ДНК, тем самым вызывая мутации или гибель клетки [27, 48, 146, 157, 182, 183, 215].

В исследованиях ряда авторов показано, что биологическая активность наночастиц металлов определяется не только их размером, но и формой. Так, наночастицы дендрической и веретенообразной формы обладают более высокой цитотоксичностью нежели частицы сферической формы [93, 209].

Таким образом, совокупность изложенных фактов свидетельствует о том, что наночастицы металлов обладают биологической активностью, выраженность которой зависит от их размера, формы, структуры поверхности, агрегатного состояния, химического состава, растворимости и целого ряда других факторов [108, 127, 196].

Анализ данных литературы позволяет из представленной группы металлов с выявленными антибактериальными свойствами выделить серебро и медь как наиболее перспективные в отношении средств для борьбы с антибиотикоустойчивыми штаммами микроорганизмов.

Получение наночастиц металлов различной формы и размера при помощи большого количества методов (химических, радиационных, фото- и электрохимических), со стабилизатором (поверхностно-активные вещества, полимеры, сополимеры, длинноцепочечные ненасыщенные карбоксилаты, твердая матрица, и гиперразветвленные дендримеры) и без него являются предметом изучения большого числа исследователей в течение длительного времени [44, 45, 158, 166, 175].

Энергия наночастиц (1-20 нм) с сильной движущей силой приводит к их агрегации и для них трудно подобрать действительно инертную среду [44], поэтому на поверхности каждой наночастицы всегда имеются продукты ее химической модификации, которые влияют на свойства наноматериала. Во

избежание этого фактора добавляют стабилизаторы, которые, в свою очередь, делятся на 3 категории:

- обеспечивающие электростатическую стабилизацию (катионные и анионные ПАВ);
- обеспечивающие пространственную стабилизацию, в том числе соединений, имеющих функциональные группы и обладающие высоким сродством к металлам (тиолы, сульфиды, амины и фосфаты);
- способны ограждать наночастицы (полимеры, циклодекстрины, дендримеры).

Стабилизаторами могут быть природные (желатин, крахмал, агар-агар и др.) или синтетические (полимеры и ПАВ); в некоторых случаях роль стабилизатора может играть восстановитель.

Во всех случаях вещества, выступающие в роли стабилизаторов должны взаимодействовать притягательным образом с поверхностью металла. Стабилизаторы сорбируются на поверхности растущих частиц и уменьшают их поверхностную энергию, тем самым снижая вероятность к агрегации и выпадению осадков [82, 97].

Среди различных форм наноразмерных материалов интерес представляют растворы наночастиц металлов. Их преимущество заключается в сравнительно узком распределении по размерам (до 12 нм) и форме (в основном сферические) и длительном времени сохранения антибактериальной активности. Есть основание полагать, что применение стабильных наночастиц металлов в водных растворах является перспективным в различных областях биологии, ветеринарии и медицины.

1.3 Перспективные направления использования наночастиц металлов в медико-биологической практике

1.3.1 Проблемы заживления осложненных гнойных ран

На сегодняшний день актуальной остается проблема лечения острых гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей микробной этиологии, связанной с распространенностью ран, с возрастанием доли затяжных, вялотекущих и хронических форм, а также с экономическими затратами на их лечение [42, 73].

Среди специалистов-практиков, занимающихся раневой инфекцией широко распространено мнение, что аэробные или факультативно-анаэробные условно патогенные микроорганизмы, такие как золотистый стафилококк, синегнойная палочка и бета-гемолитический стрептококк являются основными причинами задержки заживления острых и хронических ран. Такое мнение сложилось на основе исследований последних двух десятилетий, посвященных роли микроорганизмов в заживлении ран [142, 201].

Процессы заживления ран определяются не только объективными критериями оценки течения инфекционно-воспалительного процесса, но и механизмами патогенетического лечения и представляют особый интерес для теоретической и практической медицины. Среди большого количества работ, посвященных изучению процессов регенерации дефектов кожных покровов, особое место отводится экспериментальным исследованиям, направленным на поиск эффективных средств (антибиотики, антисептики, мази и гели на основах, углеродные сорбенты, полиэтиленоксиды, производные целлюлозы и др.) и способов для подавления развития патогенной микрофлоры (гипербарическая оксигенация, лазеромагнитотерапия, управляемая абактериальная среда, метод лечения ран под повязкой и др.) [2, 15, 16, 20, 59, 96].

Л.В. Тихонова, С.В. Шаматкова, Д.П. Бондарев [117] предложили способ лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей наружной поверхности

бедра у крыс путем вскрытия гнойного очага. Лечение осуществляли традиционным способом (промывание раны раствором перекиси водорода) и регионарным введением 0,1%-ного раствора ацетилсалициловой кислоты. Показано, что 0,1%-ный раствор ацетилсалициловой кислоты изменяет рН в тканях, что способствует активации лимфоцитов, улучшению иммунного статуса в области раны и сокращению фаз заживления.

В.М. Воробьевой [31] изучено влияние экспериментального сорбента «Ранесорб» на репаративные процессы гнойной раны на крысах. Оценка процесса заживления проводилась по клиническим, микробиологическим и морфологическим критериям на 3-и, 7-е, 10-е, 14-е, 21-е сутки. Установлено, что под влиянием сорбента сроки заживления раны, инфицированной госпитальным штаммом *S. aureus*, значительно сокращаются.

Современные препараты, используемые для лечения гнойных осложнений, должны обладать разнонаправленным действием и сочетать в себе регенеративную и антимикробную активность. Однако высокая резистентность микроорганизмов к используемым лекарственным препаратам определяет необходимость комплексного исследования и разработки нанобиоконструктов, обладающих широким спектром биологической активности в отношении инфекционно-воспалительного процесса [88, 122].

Н.Н. Венгеровичем [28] для лечения ран различной этиологии разработано два наноструктурных раневых покрытия: трёхслойное гидрогелевое биоактивное фуллеренсодержащее и на основе нано-гель-плёнки бактериальной целлюлозы. Эффективность разработанных раневых покрытий исследовалась при местном лечении гранулирующих ран после глубоких ожогов в эксперименте на крысах. Экспериментальные исследования показали, что применение раневых покрытий при местном лечении гранулирующих ран после глубоких ожогов предупреждает осложненное течение раневого процесса и сокращает сроки заживления ран в среднем на 17,5%.

В ходе эксперимента на лабораторных животных (крысах) А.В. Сипкин [103] при макроскопическом контроле за течением репаративного процесса

отметил, что в группе животных, получавших местно магнитные наночастицы ферригидрита с ампициллином, раны заживали в два раза быстрее, чем у животных, получавших только ампициллин. Уменьшение воспалительной реакции связано с сохранением антибактериальных и противовоспалительных свойств комплекса наночастица/ампициллин, что положительно влияло на сроки заживления раневых поверхностей.

А.С. Мошкиным [80] разработана программа анализа динамики поверхностных раневых процессов, с помощью которой можно прогнозировать и значительно ускорять процесс анализа морфодинамики заживления ран в эксперименте. Отмечено, что водные дисперсии оксидных наноструктур меди и серебра по сравнению с гипохлоритом натрия способствуют более раннему появлению признаков заживления гнойных ран и бактериальная обсемененность исчезает к 7-м суткам.

В работе И.В. Бабушкиной и соавт. [14] изучено влияние наночастиц цинка в виде суспензии и в комплексном соединении с биополимером хитозаном на скорость регенерации полнослойной кожной раны у экспериментальных животных. Показано, что использование суспензий наночастиц цинка в изотоническом растворе хлорида натрия оказывается эффективным при местном лечении неинфицированных ран. Наиболее выраженное регенеративное действие отмечено у комплексного препарата наночастиц цинка на основе хитозана.

1.3.2 Использование наночастиц металлов для антимикробной фотодинамической терапии

Для борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний помимо использования химиотерапевтических средств особое место занимает фотодинамическая терапия, как одна из новых эффективных антимикробных методик. Основой такой терапии являются фотосенсибилизаторы, которые

представляют собой специфические вещества, характеризующиеся избирательной чувствительностью к определенным длинам волн оптического диапазона [60, 62, 83, 89].

На сегодняшний день таких веществ известно более 1 000 и они имеют как природное, так и синтетическое происхождение (хлорофиллы, фикобилины, порфирины и промежуточные продукты их синтеза, некоторые антибиотики, хинин, рибофлавин и ряд других препаратов). Такие фотосенсибилизаторы должны обладать следующими характеристиками: химической чистотой и однородностью состава; отсутствием темновой токсичности; высокой способностью к аккумуляции в ткани-мишени; быстрой элиминацией из организма больного; высокой фотохимической активностью, характеризующейся высоким квантовым выходом синглетного кислорода; поглощением света в длинноволновой части спектра (600-800 нм), в которой биологические ткани наиболее прозрачны, с высоким коэффициентом экстинкции [25, 58, 163, 187].

Каждая бактериальная клетка поглощает и накапливает в большом количестве молекулы фотосенсибилизирующего вещества, а большинство микроорганизмов используют кислород в своем метаболическом цикле, поэтому с точки зрения реализации фотодинамических эффектов не существует микроорганизмов, устойчивых к этому методу. Это дает возможность использовать фотодинамическую терапию для лечения инфекционно-воспалительных процессов, вызванных различными антибиотикоустойчивыми штаммами микроорганизмов. При этом полученный бактерицидный эффект не оказывает губительного влияния на нормальную микрофлору организма, так как лимитируется зоной лазерного облучения сенсibilизированных тканей, что позволяет избежать при местной фотодинамической терапии побочного эффекта [9, 40, 49, 112, 120, 144, 149].

С точки зрения реализации фотодинамических эффектов не существует микроорганизмов, устойчивых к этому методу, так как каждая микробная клетка активно поглощает и накапливает в большом количестве молекулы фотосенсибилизирующего вещества, а большинство микроорганизмов

используют кислород в своем метаболическом цикле. Это позволяет использовать антибактериальную фотодинамическую терапию для лечения инфекционных заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, в том числе и характеризующихся множественной антибиотико-устойчивостью. Бактерицидный характер действия фотодинамической терапии не оказывает губительного влияния на нормальную микрофлору организма.

Фотодинамическое повреждение носит локальный характер, а бактерицидный эффект лимитируется зоной лазерного облучения сенсibilизированных тканей, это позволяет избежать при местной фотодинамической терапии побочного эффекта, наблюдаемого при применении антибиотиков и антисептиков для лечения инфекционных заболеваний.

Положительные результаты лечения гнойно-воспалительных заболеваний методом фотодинамической терапии показывают высокую эффективность данного метода в отношении аэробных, факультативно- и облигатноанаэробных бактерий, микроскопических грибов [9, 40, 49, 149, 213].

М.В. Куликова и В.И. Кочубей [70] в своем исследовании воздействовали на штаммы *S.aureus*, *S.simulans*, *Dermabacter hominis* наночастицами Fe_2O_3 и дополнительно использовали светодиод с плотностью мощности светового потока $31,5 \text{ мВт/см}^2$ в диапазоне длин волн от 385 до 425 нм, что соответствует максимуму поглощения видимой области света наночастицами. Временная экспозиция воздействия опытных образцов на штаммы составляла 5, 10, 15 и 30 минут. В результате обнаружена зависимость изменения концентрации патогенной микрофлоры не только от времени облучения, но и от концентрации наночастиц в суспензии.

В.А. Гинюк и соавт. [34] показали эффективность метода фотодинамической терапии при аппликационном способе применения фотосенсибилизаторов и метиленового синего при лечении гнойных ран у крыс. Выраженное антибактериальное и ранозаживляющее действие проявлялось за счет ускорения некролитических процессов, снижения воспалительной реакции, стимуляции развития грануляционной ткани и краевой эпителизации.

Установлено, что применение фотодинамической терапии при лечении гнойно-воспалительных процессов является патогенетически обоснованным и эффективным.

Отмечено отсутствие осложнений и развития устойчивости к антимикробной фотодинамической терапии, а также возможность проведения повторных курсов лечения [26, 118]. Помимо этого, установлена эффективность использования антимикробной фотодинамической терапии для лечения гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации, в том числе и нозокомиальных инфекций [111, 120, 129, 144].

Таким образом, анализ данных литературы позволяет из представленной группы металлов, с выявленными антибактериальными свойствами, выделить серебро и медь как наиболее перспективные в отношении средств для борьбы с полирезистентными штаммами микроорганизмов. Среди различных форм использования наноразмерных материалов интерес представляют дисперсии, суспензии и золи наночастиц металлов. Их преимущество заключается в сравнительно узком распределении по размерам и форме и длительном времени сохранения антибактериальной активности. Есть основание полагать, что стабильные наночастицы металлов в водных дисперсиях найдут полезные применения в биологии и медицине.

До настоящего времени нет достаточного количества исследований, посвященных влиянию водных дисперсий серебра и меди на клинические штаммы грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Поэтому целесообразность изучения этого вопроса представляется актуальной в связи с возможностью широкого применения в различных сферах жизнедеятельности, в том числе и в ветеринарии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 2 Объект, материалы и методы

Экспериментальные исследования в период с 2010 по 2014 гг. выполнены:

- в отделе фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России;
- на кафедре «Экология» Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. на базе научной биологической лаборатории и НОЦ «Промышленная экология»;
- на кафедре биохимии и биофизики Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского;
- на кафедре физиологии человека и животных Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского.

2.1 Экспериментальные модели

Объектом исследования явились стандартные и клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, характеристика которых представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы *S. aureus*

Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Характеристика штамма
209 P		кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского	стандартный штамм
№ 84	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	клинический штамм (MSSA)
№ 97	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-//- (MSSA)
№ 135	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-//- (MSSA)

Продолжение таблицы 1

Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Характеристика штамма
№ 157	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MSSA)
№ 178	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MSSA)
№ 179	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MSSA)
№ 224	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MSSA)
№ 273	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MRSA)
№ 274	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MSSA)
№ 275	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/- (MRSA)

Таблица 2. – Штаммы *E. coli*

Название штамма	Дата выделения	Место выделения	Характеристика штамма
113-13		кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского	стандартный штамм
№ 227	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	клинический штамм
№ 232	2010	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 245	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 337	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 375	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 444	2010	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 450	2010	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 707	2010	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 738	2011	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-
№ 872	2010	отделение лабораторной диагностики ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России	-/-

2.2 Химические соединения, использованные в работе

В исследованиях использовали водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов, предоставленные ООО НПК «Наномет» (Москва), полученные путем биохимического синтеза [53], 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 безопасными. Характеристика водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди согласно паспорту, представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика опытных образцов

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

Синтез наночастиц проводился в молекулярных (водных или неводных) растворах или в обратных мицеллах (водный раствор соли металла/поверхностно-активное вещество/неполярный растворитель). В обратных мицеллах реакции восстановления и формирования наночастиц протекали в водном ядре мицеллы, образованной молекулами поверхностно-активного вещества с помощью природных биологически активных веществ – растительных пигментов из группы флавоноидов [53, 55].

В соответствии с паспортом качества наночастицы имели сферическую форму и размеры от 7 до 12 нм. Разброс по размерам составлял ± 2 нм. Срок годности – от 6 мес. до 2-х лет с даты изготовления.

Размеры наночастиц в водном растворе определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) на приборах Coulter N4 MD (Coulter Electronics, США) и Horiba LB 550 (Horiba, Япония). Микрофотографии наночастиц получали методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием электронного микроскопа LEO912 AB OMEGA с ускоряющим напряжением 120 кВ (Carl Zeiss, Германия), доступного в центре коллективного пользования биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Согласно рекомендации фирмы-производителя, в исследованиях использовали следующие концентрации дисперсий: 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %. Для каждой концентрации опытного образца рассчитывалось содержание наночастиц серебра и меди в составе водных дисперсий (мкг/мл) и стабилизатора АОТ (мМ), которые представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Содержание наночастиц металлов в дисперсиях (мкг/мл)

Исходные дисперсии	Концентрации дисперсий, %					
	3	2	1	0,5	0,25	0,125
$C_{Ag} = 3,9 \text{ мМ} = 0,422 \text{ мг/мл}$, $C_{АОТ} = 37 \text{ мМ}$	12,66	8,44	4,22	2,11	1,06	0,528
$C_{Ag} = 4,3 \text{ мМ} = 0,465 \text{ мг/мл}$, $C_{АОТ} = 5 \text{ мМ}$	13,95	9,3	4,65	2,325	1,162	0,581
$C_{Cu} = 0,25 \text{ мМ} = 0,016 \text{ мг/мл}$, $C_{АОТ} = 60 \text{ мМ}$	0,48	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02
$C_{Cu} = 0,25 \text{ мМ} = 0,016 \text{ мг/мл}$, $C_{АОТ} = 23 \text{ мМ}$	0,48	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02

Таблица 5 – Содержание стабилизатора ПАВ АОТ в дисперсиях наночастиц металлов

Исходные растворы	Концентрации растворов, %					
	3	2	1	0,5	0,25	0,125
$C_{Ag} = 3,9$ мМ, $C_{АОТ} = 37$ мМ	1,11	0,74	0,37	0,185	0,0925	0,0463
$C_{Ag} = 4,3$ мМ, $C_{АОТ} = 5$ мМ	0,15	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0062
$C_{Cu} = 0,25$ мМ, $C_{АОТ} = 60$ мМ	0,72	0,12	0,6	0,3	0,15	0,075
$C_{Cu} = 0,25$ мМ, $C_{АОТ} = 23$ мМ	0,69	0,46	0,23	0,115	0,0057	0,0287

2.3 Методы микробиологических исследований

Определение спектра чувствительности клинических штаммов исследуемых микроорганизмов к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04).

Оценку антимикробной активности исследуемых водных дисперсий наночастиц серебра и меди проводили с использованием метода серийных разведений (МУК 4.2.1890-04). Полученные разведения исследуемых препаратов вносили в предварительно расплавленный и остуженный мясо-пептонный агар (МПА) с учетом концентрации и разливали в стерильные чашки Петри. В качестве контроля использовали посеvy без добавления дисперсий наночастиц металлов. Жизнеспособность бактерий оценивали, определяя методом серийных разведений число колониеобразующих единиц (КОЕ).

Микробную взвесь каждого штамма готовили из суточной культуры с оптической плотностью 0,1 с помощью прибора «Densi La Meter». Затем титровали в физиологическом растворе до конечной концентрации 10^4 м.к./мл. Микробную взвесь каждого штамма наносили по 100 мкл на поверхность МПА и равномерно распределяли шпателем. Посевы инкубировали в течение 24 часов в

термостате при температуре 37 °С, после чего подсчитывали количество выросших колоний и сравнивали их с контрольным посевом. Для подтверждения достоверности полученных результатов все исследования проводили с десятикратным повторением.

Адгезивную способность бактериальных клеток определяли при помощи методов В.И. Брилис и соавт. (1986) и С.С. Гизатулиной и соавт. (1991). 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 °С 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.

Адгезивные свойства бактериальных клеток, согласно методики, оценивали по трем показателям: среднему показателю адгезии (СПА), коэффициенту адгезии (КА) и индексу адгезии микроорганизма (ИАМ).

В экспериментах по облучению бактериальных клеток в качестве источников синего излучения использовали светодиод с максимумом спектра испускания $\lambda=405\pm 20$ нм, плотность мощности излучения – 23 мВт/см², а также экспериментальный прибор «Chagub» с максимумом спектра испускания $\lambda=405$, плотность мощности излучения – 5-80 мВт/ см² [205]. Из суточных культур исследуемых бактерий готовили взвесь в изотоническом растворе хлорида натрия по оптическому стандарту мутности 5 Ед (ГИСК им. Тарасевича). Взвесь титровали до конечной концентрации 100 м.к./мл и вносили по 0,1 мл в пробирки с 0,9 мл физиологического раствора. В опытные пробирки были добавлены субингибирующие концентрации растворов наночастиц металлов. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Из каждой контрольной и опытной пробирки забирали по 0,1 мл взвеси и вносили в ячейки планшета, которые подвергали воздействию синего излучения в течение 30 мин. Затем из

каждой ячейки делали высев по 0,1 мл взвеси на чашки Петри с МПА. Параллельно на чашки высевали по 0,1 мл взвеси исследуемых микроорганизмов, не подвергавшихся облучению, из контрольных и опытных пробирок. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Оценку влияния излучения на микроорганизмы проводили путем подсчета КОЕ.

2.4 Определение токсикологических характеристик водных дисперсий наночастиц серебра и меди

Согласно методике, оценку воздействия водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов, присутствующих в исследуемой среде, проводили по показателям смертности дафний (*D. magna* Straus), в сравнении с контрольной культурой в пробах, которые не содержали исследуемых дисперсий (контроль). Критерием острого токсического действия соединения служила гибель 50 % и более биотест-объектов за 48 часов в исследуемой пробе, по сравнению с контрольными пробами, в которых все рачки сохраняли свою жизнеспособность.

Для культивирования рачков, приготовления рабочих растворов исследуемых наночастиц серебра и меди, разведения и контроля использовали отстоявшуюся водопроводную воду нейтральной реакцией (pH=7) и средней жесткости (2,5-5,3 экв/л).

Для оценки острой токсичности готовили двойные последовательные разведения исследуемых соединений от максимальной (1000 мкг/мл) к минимальной (2 мкг/мл) в воде объемом 100 мл. Биотестирование осуществляли в пробирках объемом 100 см³, в которые вносили по 50 см³ воды, содержащей определенные концентрации исследуемых препаратов. В пробирки помещали по десять дафний в возрасте 6-24 ч.

Посадку рачков с помощью сачка начинали с контрольной пробы. Затем дафний помещали в пробирки с исследуемыми соединениями. После каждой посадки сачок тщательно промывали культивационной водой. Для работы с контрольной пробой использовали отдельный сачок.

В опытах по определению острого токсического действия дафний кормили только перед началом эксперимента, до отсадки в пробирки с исследуемыми препаратами. Во время опыта корм в пробирки не вносили.

Опытные и контрольные пробирки с дафниями помещали в климатостат. Все опыты проводили в трех повторностях.

Учет смертности дафний проводили каждые 24 часа в опытных и контрольных пробах. Эксперимент прекращали, если во всех опытных пробирках в течение 24 часов наблюдалась гибель более 50 % рачков. Неподвижные особи считали погибшими, если они не начинали двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания пробирки.

Также учитывали количество сброшенных эфиппиумов, так как установлено, что в результате реакции на токсикант, происходит линька дафний и сбрасывание эфиппиума.

2.5 Методы изучения действия наночастиц металлов в составе водных дисперсий на процесс регенерации экспериментальных гнойных ран

В исследованиях использовали 60 белых беспородных крыс (самок), массой 200 ± 20 г, которые содержались на стандартном рационе вивария. Все эксперименты были выполнены в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и предписаниями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990).

Животным под наркозом в стерильных условиях моделировалась гнойная рана по методике П.И. Толстых [42]. Для этого на выбритом от шерсти участке

межлопаточной области вырезали кожный лоскут с подкожной клетчаткой по контуру, предварительно нанесенному с помощью трафарета. В полученную рану диаметром 15 мм вводили марлевый тампон, содержащий взвесь суточной культуры *S. aureus* 209 P в концентрации 10^9 м.т./мл, после чего рану ушивали (рисунок 1).

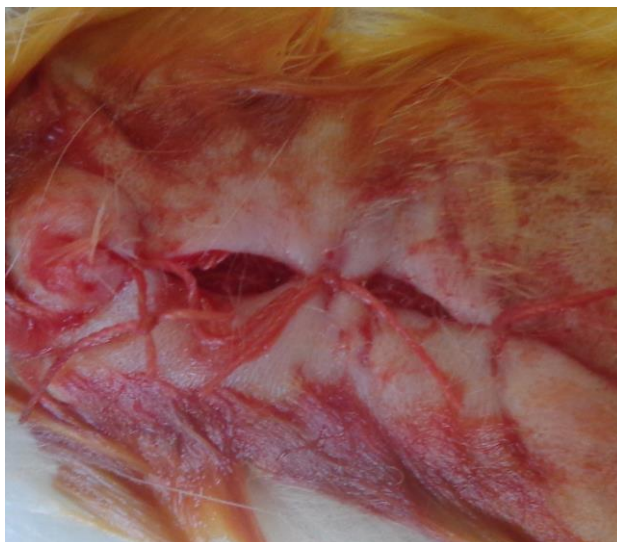


Рисунок 1– Формирование экспериментальной гнойной раны.

Через 48 часов края раны разводили, удаляли тампон и с помощью 3%-ного раствора перекиси водорода удаляли гной (рисунок 2).



Рисунок 2 – Состояние раны через 48 часов.

Ежедневно опытным группам животных на поверхность раны наносили исследуемые препараты. Раны контрольной группы крыс оставались без лечения. Течение раневого процесса у экспериментальных животных оценивали по внешнему состоянию раны, а также по изменению площади ее поверхности каждые 2 суток.

Для оценки эффективности лечения ран рассчитывали ежесуточное уменьшение площади ран в % [68]:

$$S = \frac{(Sp - Sn) \times 100}{Sp \times t} \quad (1)$$

где S – ежесуточное уменьшение площади ран, %/сут.;

Sp – величина площади раны при предшествующем измерении;

Sn – величина площади раны в настоящий момент;

t – число дней между первым и последним измерением.

2.6 Статистические методы

Непараметрические методы использовали для обработки результатов, полученных при влиянии водных и водных диализованных растворов наночастиц серебра и меди на стандартные и клинические штаммы *S. aureus* и *E. coli*.

На первом этапе статистического анализа проверяли гипотезу нормальности распределения данных. Для проверки использовался критерий Шапиро-Уилка, являющийся частным случаем критериев согласия (Shapiro S.S., Wilk M.B., 1965). Выявлено, что изучаемые показатели не описываются законом нормального распределения (не соответствуют нулевой гипотезе), поэтому дальнейшие исследования зависимостей проводили методами непараметрической статистики. Непараметрические методы заменяют реальные значения признака рангами, что способствует сохранению большей части информации о распределении. В данном случае не имеют значения ни параметры этого распределения, ни равенство

дисперсий. Остается в силе только предложение, что тип распределения во всех случаях одинаков [91].

При статистической обработке полученных данных проводился расчет основных вероятностных характеристик случайных величин: первого, или нижнего, квартиля (25 %), медианы (второго квартиля) для центрирования распределения и третьего, или верхнего, квартиля (75 %) [130].

Учитывая несоответствие полученных данных закону нормального распределения и малый объем выборки, для сравнения групп между собой использовали U-критерий Mann-Whitney, который представляет непараметрическую альтернативу t-критерия для независимых выборок [170]. При оформлении статистических таблиц проводили расчет Z-критерия, который является производной U-критерия Mann-Whitney при интерполяции значений U-критерия на нормальное распределение, т.е. по своей сути Z-критерий является непараметрическим аналогом t-критерия для нормального распределения, но вычислений без учета типа распределения [192].

При проверке статистических гипотез критический уровень показателя достоверности p принимали равным 0,05. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Параметрическими методами проводили обсчет полученных цифровых данных при изучении адгезивной активности, фотодинамической терапии, токсикологических свойств и ранозаживляющей способности водных и водных диализованных растворов наночастиц металлов.

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) [11]:

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

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 $p \leq 0,05$.

Глава 3 Изучение биологической активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов

3.1 Анализ устойчивости клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli* к антибактериальным препаратам

На первом этапе работы была изучена чувствительность клинических штаммов исследуемых микроорганизмов к действию современных антимикробных препаратов. В работе использовали антибиотики, относящиеся к группам β -лактамов, макролидов, аминогликозидов, линкозамидов, а также химиотерапевтические средства группы фторхинолонов. Выбор препаратов был проведен согласно требованиям МУК 4.2.1890-04 [79] для определения спектра устойчивости грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Оценка чувствительности клинических штаммов *S. aureus* к действию β -лактамных антибиотиков позволила установить, что все бактерии проявили устойчивость к защищенному пенициллину – ампициллину/сульбактаму, а 20 % штаммов (№№ 273, 275) были устойчивы к оксациллину, что позволило отнести их к группе MRSA (таблица 6).

Таблица 6 - Антибиотикочувствительность клинических штаммов *S. aureus* к антибактериальным препаратам и химиотерапевтическим средствам

Антибактериальные препараты и химиотерапевтические средства		Клинические штаммы <i>S. aureus</i>									
		84	97	135	157	178	179	224	273	274	275
Группа пенициллинов	ампициллин/ сульбактам	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	оксациллин	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Группа цефалоспоринов	цефазолин	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	цефотаксим	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R
	цефтазидим	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	цефтриаксон	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R
Карбапенемы	меропенем	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
	имипенем	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R
Макролиды	кларитромицин	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Группа аминогликозидов	гентамицин	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S
	амикацин	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S
Группа фторхинолонов	ципрофлоксацин	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R
	моксифлоксацин	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R
	норфлоксацин	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
	левофлоксацин	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R

Низкую чувствительность проявили клинические штаммы *S. aureus* и к действию антибиотиков группы цефалоспоринов: к цефазолину был чувствителен только штамм № 84, к цефотаксиму – чувствительность выявлена у 60 %, а к цефтриаксону – у 40 % штаммов. К цефтазидиму все клинические штаммы *S. aureus* были резистентны.

Из всех исследованных β -лактамных антибиотиков наименьшая резистентность клинических штаммов *S. aureus* была отмечена для представителей ряда карбапенемов: к меропенему и имипенему чувствительными оказались 60 % исследуемых штаммов.

Клинические штаммы *S. aureus* проявили высокую устойчивость к 14- и 15-членным макролидам: к кларитромицину и клиндамицину были резистентны 90 % штаммов. Большая чувствительность исследуемых бактерий наблюдалась к представителю группы линкозамидов – линкомицину, которую проявили 50 % штаммов.

При оценке чувствительности клинических штаммов *S. aureus* к антибиотикам группы аминогликозидов учитывались особенности интерпретации результатов, так как при выявлении устойчивости к гентамицину выделенный штамм рассматривался как устойчивый ко всем препаратам этой группы. Полученные результаты позволили выявить 40 % штаммов, устойчивых к аминогликозидам.

При исследовании степени устойчивости клинических штаммов *S. aureus* к препаратам группы фторхинолонов выявлены различия в их чувствительности к представителям разных поколений препаратов: к ципрофлоксацину чувствительными оказались 30 %, а к норфлоксацину, лефлоксацину и моксифлоксацину – 60 % штаммов.

В таблице 7 представлены результаты чувствительности клинических штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам. Было установлено отсутствие антимикробной активности комбинированного препарата на основе полусинтетических пенициллинов и ингибиторов бета-лактамаз ампициллина/сульбактама в отношении исследуемых грамотрицательных

бактерий. Кроме того, большинство клинических штаммов *E. coli* проявили высокую резистентность ко всем представителям группы цефалоспоринов, уровень которой составил в зависимости от поколения от 60 до 90 %.

Таблица 7 - Антибиотикочувствительность клинических штаммов *E.coli* к действию антибактериальных препаратов и химиотерапевтических средств

Антибактериальные препараты и химиотерапевтические средства		Клинические штаммы <i>E.coli</i>									
		232	707	227	245	337	375	738	444	450	872
Группа пенициллинов	ампициллин/сульбактам	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Группа цефалоспоринов	цефазолин	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
	цефотаксим	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R
	цефтазидим	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
	цефтриаксон	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	цефепим	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
	цефоперазон	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R
	цефамандол	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
Карбапенемы	меропенем	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S
	имипенем	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R
	эртапенем	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Макролиды	кларитромицин	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Группа аминогликозидов	амикацин	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
	гентамицин	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
Группа фторхинолонов	ципрофлоксацин	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
	норфлоксацин	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
	пefлоксацин	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
	левофлоксацин	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R

Из всех β -лактамных антибиотиков наибольшую антимикробную активность в отношении клинических штаммов *E. coli* проявили препараты группы карбапенемов – 50 % штаммов были чувствительны к меропенему и имипенему, однако только 10 % штаммов проявили чувствительность к эртапенему.

Представитель группы полусинтетических 14-членных макролидов – кларитромицин проявил низкую активность в отношении исследуемых штаммов *E. coli*, среди которых только 20 % были чувствительны к данному препарату.

При оценке антимикробного действия представителей группы аминогликозидов в отношении *E. coli* была выявлена большая активность гентамицина, к которому были чувствительны 70 % штаммов, по сравнению с

амикацином, чувствительность к которому была установлена у 30 % исследуемых штаммов.

Из всех представителей химиотерапевтических препаратов группы фторхинолонов наибольшей активностью характеризовался ципрофлоксацин, к которому были чувствительны 70 % клинических штаммов *E. coli*. К остальным представителям этой группы грамотрицательные бактерии проявили высокую устойчивость: к спарфлоксацину были резистентны 70 %, к норфлоксацину и левофлоксацину – 80 %, к пефлоксацину – 90 % исследованных штаммов.

Таким образом, предварительное тестирование чувствительности клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli* к современным антибиотикам и химиотерапевтическим средствам показало, что большинство из них характеризовались множественной устойчивостью к действию антимикробных препаратов.

Полученные результаты явились предпосылкой для поиска путей преодоления резистентности клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам с использованием водных дисперсий наночастиц меди и серебра.

3.2 Изучение антимикробной активности

водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди

Антимикробную активность исследуемых препаратов с целью отбора наиболее эффективных образцов определяли в отношении стандартных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий.

3.2.1 Влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов и стабилизатора на выживаемость стандартных штаммов бактерий

Была проведена оценка влияния водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди на выживаемость стандартных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий – *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Стафилококки проявили высокую чувствительность к водным и водным диализованным дисперсиям наночастиц металлов, значения МПК которых составило 0,5 % во всех случаях. Концентрации препаратов от 3 до 0,5 % обладали бактерицидным характером действия в отношении стандартного штамма *S. aureus* 209 P. Низкие концентрации рабочих разведений (1 и 0,5 %) оказывали частично бактерицидное действие на клетки золотистого стафилококка, т.к. на питательных средах наблюдался характерный рост, однако значения количества КОЕ были приблизительно в 2 раза меньше по сравнению с контролем.

Таблица 8 – Действие водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди на стандартные штаммы бактерий

Лабораторный шифр опытных образцов	контроль	3 %	2 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %
	число КОЕ						
<i>S. aureus</i> 209 P							
AgW	517 (489; 554)	–	–	–	–	396 (385; 414) Z=3,75 p=0,000183	426 (408; 442) Z=3,75 p=0,000183
AgWD	517 (489; 554)	–	–	–	–	337 (302; 348) Z=3,75 p=0,000183	400 (388; 424) Z=3,75 p=0,000183
CuW	517 (489; 554)	–	–	–	–	209 (189; 232) Z=3,75 p=0,000183	400 (387; 418) Z=3,75 p=0,000183
CuWD	517 (489; 554)	–	–	–	–	459 (434; 487) Z=2,91 p=0,003611	487 (465; 503) Z=1,92 p=0,053903

Продолжение таблицы 8

Лабораторный шифр опытных образцов	контроль	3 %	2 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %
	число КОЕ						
<i>E. coli</i> 113-13							
AgW	701 (674; 718)	–	–	–	24 (17; 26) Z=3,75 p=0,000183	74 (67; 79) Z=3,75 p=0,000183	402 (387; 414) Z=3,75 p=0,000183
AgWD	701 (674; 718)	–	–	–	34 (32; 38) Z=3,75 p=0,000183	95 (88; 103) Z=3,75 p=0,000183	229 (202; 254) Z=3,75 p=0,000183
CuW	701 (674; 718)	–	–	–	711 (691; 732) Z=0,86 p=0,384674	709 (678; 738) Z=0,45 p=0,650148	723 (685; 742) Z=1,28 p=0,198766
CuWD	701 (674; 718)	–	–	–	496 (472; 517) Z=3,75 p=0,000183	504 (475; 539) Z=3,75 p=0,000183	608 (596; 643) Z=3,75 p=0,000183

Примечания

1 в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили Me (25%;75%)

2 Z, p – статистическая значимость различий по сравнению с контролем

Не выявлено принципиальных отличий показателей КОЕ при использовании водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов. Кроме того, выживаемость стафилококка не зависела от вида используемых наночастиц.

В отношении стандартного штамма *E. coli* 113-13 водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов также проявили высокую антимикробную активность, однако значения МПК были в 2 раза выше по сравнению со стафилококками и были характерны для 1 %-ной дисперсии.

Концентрации дисперсий наночастиц от 3 до 1 % в отношении кишечной палочки обладали бактерицидным характером действия, а более низкие концентрации – частично бактерицидным. Выявлено, что клетки *E. coli* 113-13 проявили большую чувствительность к наночастицам серебра как в составе водных, так и водных диализованных дисперсий, т.к. показатели количества КОЕ при использовании 0,5 %-ной и 0,25 %-ной дисперсий были ниже по сравнению с контрольными значениями приблизительно в 20 и 10 раз соответственно.

На следующем этапе работы было исследовано влияние композиционных смесей наночастиц металлов на выживаемость стандартных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий (таблица 9).

Таблица 9 – Действие смеси водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди на стандартные штаммы бактерий

Лабораторный шифр опытных образцов	контроль	3 %	2 %	1 %	0,5 %	0,25 %	0,125 %
	число КОЕ						
<i>S. aureus</i> 209 P							
AgW+CuW	517 (489; 554)	–	–	–	–	141 (112; 147) Z=3,75 p=0,000183	232 (217; 276) Z=3,75 p=0,000183
AgWD+CuWD	517 (489; 554)	–	–	–	–	434 (416; 468) Z=3,47 p=0,000507	504 (479; 512) Z=1,21 p=0,226477
<i>E. coli</i> 113-13							
AgW+CuW	701 (674; 718)	–	–	–	488 (457; 509) Z=3.75 p=0.000183	520 (496; 537) Z=3.75 p=0,000183	636 (612; 665) Z=2.72 p=0,006502
AgWD+CuWD	701 (674; 718)	–	–	–	405 (389; 417) Z=3,75 p=0,000183	501 (488; 519) Z=3,75 p=0,000183	639 (603; 675) Z=2,72 p=0.006502

Примечания

1 в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили Me (25%;75%)

2 Z, p – статистическая значимость различий по сравнению с контролем

При анализе действия композиционных смесей водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов в отношении стандартных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий наблюдались сходные результаты с действием дисперсий наночастиц металлов одного вида. Стафилококки проявили высокую чувствительность как к смеси водных дисперсий наночастиц серебра и меди, так и к смеси их диализованных дисперсий, значения МПК которых также составили 0,5 %. Однако показатели КОЕ позволили судить о большей чувствительности *S. aureus* 209 P к смеси водных дисперсий наночастиц металлов, т.к. наблюдалось их снижение в 2,5-5 раз

по сравнению с контролем при использовании рабочих концентраций дисперсий 0,125 и 0,25 соответственно.

Клетки кишечной палочки характеризовались высокой чувствительностью к действию композиционных смесей наночастиц металлов в рабочих концентрациях от 3 до 1 %. При использовании рабочих разведений с концентрациями наночастиц серебра и меди 0,5 и 0,25 % показатели КОЕ снижались по сравнению с контрольными значениями приблизительно в 2 раза, что позволило судить об их частично бактерицидном характере действия. Показатели выживаемости кишечной палочки при концентрации в водных и водных диализованных дисперсиях наночастиц металлов 0,125 % достоверно не отличались от контрольных значений.

Поскольку стабилизатор ПАВ АОТ входит в состав как водных, так и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов представляло интерес определить его влияние на выживаемость стандартных штаммов исследуемых микроорганизмов. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Действие стабилизатора АОТ на стандартные штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий

Лабораторный шифр опытных образцов	Контроль	3 %	2 %	1 %	0,5 %
	число КОЕ				
АОТ	<i>S. aureus</i> 209 P				
	517 (489; 554)	–	313 (298; 321) Z=3,75 p=0,000183	335 (306; 365) Z=3,75 p=0,000183.	506 (488; 544) Z=0,00 p=1,000000
	<i>E. coli</i> 113-13				
	701 (674; 718)	450 (417; 479) Z=3,75 p=0,000183	698 (678; 711) Z=0,53 p=0,596702	729 (708; 742) Z=1,73 p=0,082100	715 (695; 741) Z=1,36 p=0,173618

Примечания

1 в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили Me (25%;75%)

2 Z, p – статистическая значимость различий по сравнению с контролем

Было установлено, что стандартный штамм *S. aureus* 209 P проявил большую чувствительность к ПАВ АОТ, чем *E. coli* 113-13. Бактерицидный

характер действия был установлен для 3%-ной концентрации ПАВ АОТ, которая вызывала абсолютную гибель клеток золотистого стафилококка. Концентрации ПАВ АОТ 2 и 1 % характеризовались частично бактерицидным действием на клетки золотистого стафилококка, т.к. происходило снижение значений КОЕ приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем. Концентрация стабилизатора 0,5 % не оказывала ингибирующего действия на клетки *S. aureus* 209 P, т.к. значения КОЕ достоверно не отличались от контрольных значений.

Стандартный штамм *E. coli* 113-13 проявил низкую чувствительность к действию ПАВ АОТ, т.к. только его самая высокая из рабочих концентраций 3 % вызывала частичное ингибирование роста бактерий и снижение показателей КОЕ приблизительно в 1,5 раза по сравнению с контролем. Остальные концентрации стабилизатора не оказывали ингибирующего действия в отношении кишечной палочки, т.к. по показателям КОЕ они достоверно не отличались от контрольных значений.

Таким образом, стандартные штаммы исследуемых бактерий характеризовались чувствительностью к действию опытных образцов наночастиц металлов, которая носила дозозависимый характер.

3.2.2 Влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов и стабилизатора на выживаемость клинических штаммов бактерий

Поскольку клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, используемых в работе, характеризовались множественной антибиотикорезистентностью, представляло интерес изучить влияние дисперсий наночастиц металлов на их выживаемость. Результаты антимикробной активности исследуемых водных дисперсий наночастиц серебра и меди в отношении клинических штаммов *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13 представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Действие водной и водной диализованной дисперсий наночастиц серебра и меди на клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий

Лабораторные шифры опытных образцов	контроль	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%
	число КОЕ						
<i>S. aureus</i> (n=10)							
AgW	428 (307; 448)	–	–	–	42 (24; 55) Z=3,77 p=0,000157	181 (104; 312) Z=2,91 p=0,003611	305 (264; 360) Z=1,96 p=0,049367
AgWD	616 (544; 736)	–	–	–	388 (172; 536) Z=2,34 p=0,019111 Z ₁ =3,02 p ₁ =0,002497	496 (464; 688) Z=1,17 p=0,241322 Z ₁ =2,94 p ₁ =0,003197	616 (544; 736) Z=0,00 p=1,000000 Z ₁ =2,94 p ₁ =0,003197
CuW	474 (369; 655)	–	–	–	–	98 (65; 211) Z=3,25 p=0,001152	373 (200; 508) Z=1,73 p=0,082100
CuWD	668 (376; 986)	–	–	–	185 (19; 232) Z=3,32 p=0,000881	315 (124; 417) Z=2,26 p=0,023343 Z ₁ =1,36 p ₁ =0,173618	460 (236; 704) Z=1,28 p=0,198766 Z ₁ =0,98 p ₁ =0,325752
<i>E. coli</i> (n=10)							
AgW	688 (604; 776)	–	–	–	2 (1; 4) Z=3,77 p=0,000157	54 (15; 90) Z=3,77 p=0,000157	180 (68; 311) Z=3,70 p=0,000212
AgWD	816 (718; 880)	–	–	–	17 (9; 39) Z=3,77 p=0,000157 Z ₁ =3,32 p ₁ =0,000881	194 (23; 246) Z=3,36 p=0,000769 Z ₁ =1,66 p ₁ =0,096305	307 (168; 576) Z=2,75 p=0,005796 Z ₁ =1,54 p ₁ =0,121225
CuW	1416 (1198; 1616)	–	–	–	757 (656; 944) Z=3,70 p=0,000212	896 (704; 1008) Z=3,62 p=0,000285	1022 (992; 1152) Z=3,32 p=0,000881
CuWD	808 (656; 1024)	–	–	–	408 (296; 736) Z=2,45 p=0,014020 Z ₁ =2,49 p ₁ =0,012612	410 (320; 608) Z=2,94 p=0,003197 Z ₁ =3,36 p ₁ =0,000769	547 (272; 800) Z=1,92 p=0,053903 Z ₁ =3,55 p ₁ =0,000381

Установлено, что оба варианта дисперсий серебра в концентрациях 3 %, 2 % и 1 % полностью подавляли рост бактерий, а в концентрациях 0,5 %, 0,25 % и 0,125 % характеризовались частичным бактерицидным действием. Таким образом, установлено, что в отношении клинических штаммов *S. aureus* наблюдалось снижение антимикробной активности водной и водной диализованной дисперсий наночастиц серебра в диапазоне концентраций от 0,5 % до 0,125 %.

Аналогичный эффект наблюдался и в отношении клинических штаммов *E. coli*, однако большая эффективность наблюдалась при использовании водной дисперсии наночастиц серебра. В отличие от клинических штаммов золотистого стафилококка антимикробная активность водной и водной диализованной дисперсий наночастиц серебра была более выражена согласно показателям КОЕ.

Изучение влияния дисперсий наночастиц меди на клинические штаммы *S. aureus* показало, что максимально выраженное бактерицидное действие водной дисперсии проявлялось в концентрациях наночастиц металла в диапазоне от 3 %-ной до 0,5 %-ной, а водной диализованной дисперсии в концентрациях от 3 % до 1 %. В концентрациях 0,25 % и 0,125 % водная диализованная дисперсия характеризовалась частичным бактерицидным действием в отношении золотистого стафилококка, показатели выживаемости которого, согласно значениям КОЕ, снижались приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем.

В отношении клинических штаммов *E. coli* как водная, так и водная диализованная дисперсии наночастиц меди проявили сходную антимикробную активность: дисперсии металлов в концентрации от 3 % до 1 % характеризовались бактерицидным эффектом, вызывая абсолютную гибель клеток кишечной палочки, а в концентрациях от 0,5 до 0,125 % – наблюдалось дозозависимое частичное бактерицидное действие.

На следующем этапе исследования была проведена оценка антимикробной активности композиционных смесей дисперсий наночастиц металлов в отношении клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полученные результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Действие композиционной смеси водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди на клинические штаммы бактерий

Лабораторные шифры опытных образцов	контроль	3%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%
	число КОЕ						
<i>S. aureus</i> (n=10)							
AgW+ CuW	377 (328; 521)	–	–	–	–	58 (35; 100) Z=3,77 p=0,000157	249 (175; 433) Z=1,96 p=0,049367
AgWD+CuWD	688 (408; 896)	–	–	–	308 (224; 496) Z=1,88 p=0,058593	488 (320; 848) Z=0,75 p=0,449692 Z ₁ =3,77 p ₁ =0,000157	528 (352; 848) Z=0,83 p=0,405680 Z ₁ =2,57 p ₁ =0,010166
<i>E. coli</i> (n=10)							
AgW+ CuW	904 (848; 1040)	–	–	–	108 (56; 168) Z=3,66 p=0,000246	272 (164; 528) Z=3,06 p=0,002202	624 (280; 848) Z=2,26 p=0,023343
AgWD+CuWD	904 (848; 1040)	–	–	–	14 (2; 27) Z=3,77 p=0,000157 Z ₁ =2,87 p ₁ =0,004072	137 (111; 159) Z=3,77 p=0,000157 Z ₁ =2,57 p ₁ =0,010166	422 (296; 523) Z=3,51 p=0,000440 Z ₁ =1,17 p ₁ =0,241322

Примечания

- 1 – в каждом случае приведены медиана, нижний и верхний квартили (25%;75%)
- 2 – «–» - отсутствие КОЕ на питательной среде
- 3 – Z, p – по сравнению с группой контроля
- 4 – Z₁, p₁ – по сравнению с водной дисперсией

При исследовании антибактериальной активности композиционных смесей дисперсий наночастиц металлов на клинические штаммы *S. aureus* установлено, что бактерицидное действие наблюдалось в диапазоне концентраций от 3 % до 0,5 % смеси водных дисперсий наночастиц серебра и меди. Подобным действием обладала смесь водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди в концентрациях от 3 % до 1 %. Частичное бактерицидное действие оказывали 0,25 %-ные и 0,125 %-ные водные дисперсии композиционных смесей и 0,5 %-ные композиционные смеси диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди. Кроме того, установлено, что бактерицидный эффект при действии водной

дисперсии наночастиц меди и композиционной смеси наночастиц металлов проявляется в более широком диапазоне концентраций (от 3 % до 0,5 %), в отличие от водной дисперсии наночастиц серебра (от 3 % до 1 %). Данный эффект можно объяснить действием наночастиц меди, которые проявляют по отношению к клиническим штаммам *S. aureus* более агрессивное воздействие, чем наночастицы серебра. В концентрациях 0,25 %-ные и 0,125 %-ные водные дисперсии меди и смеси наночастиц серебра и меди характеризовались сходной с водными дисперсиями наночастиц серебра антибактериальную активность.

Бактерицидный эффект смеси водных дисперсий наночастиц серебра и меди, а также водных диализованных дисперсий наночастиц этих же металлов при действии на клинические штаммы *E. coli* наблюдался при использовании концентраций 3 %, 2 % и 1 %. Смесь водных дисперсий в диапазоне концентраций 0,5 %-0,125 % и водных диализованных дисперсий в концентрациях 0,5 % и 0,25 % характеризовалась частично бактерицидным действием в отношении кишечной палочки, которое в большей степени было выражено для смеси водных диализованных дисперсий наночастиц металлов.

Следует отметить, что 0,5 %-ные и 0,25 %-ные диализованные дисперсии серебра и смеси серебра и меди проявляют практически одинаковую бактерицидную активность в отношении клинических штаммов *E. coli*, существенно превышающую таковую водной диализованной дисперсии меди.

Таким образом, полученные результаты позволяют судить о высокой антибактериальной активности в отношении клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli* водных дисперсий наночастиц серебра и меди, а также их композиционных смесей.

Сравнение между собой антимикробной активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов показало, что при равных процентных концентрациях наночастиц серебра и меди наблюдается более выраженное антибактериальное действие водных дисперсий, что позволило предположить влияние стабилизатора АОТ к усилению их биоцидного эффекта. Для этого была изучена антимикробная активность ПАВ АОТ в отношении

клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Действие водного раствора ПАВ АОТ на клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий

Лабораторный шифр опытных образцов	Контроль	3%	2%	1%	0,5%
	число КОЕ				
АОТ	<i>S. aureus</i> (n=10)				
	380 (312; 872)	0 (0; 2) Z=3,77 p=0,000157	160 (3; 432) Z=2,34 p=0,019111	294 (284; 712) Z=1,28 p=0,198766	380 (312; 872) Z=0,00 p=1,000000
	<i>E. coli</i> 113-13				
	896 (832; 1088)	441 (288; 624) Z=3,21 p=0,001315	524 (424; 787) Z=2,94 p=0,003197	524 (376; 768) Z=2,68 p=0,007285	922 (864; 1088) Z=0,26 p=0,791337

Примечания

1 в каждом случае приведены медиана, верхний и нижний квартили Me (25%;75%)

2 Z, p – статистическая значимость различий по сравнению с контролем

Установлено, что водный раствор стабилизатора АОТ в концентрации 3 % полностью подавлял рост золотистого стафилококка, а наиболее выраженное частично бактерицидное действие отмечено при использовании 2 %-ной концентрации раствора.

Установлено, что водный раствор стабилизатора АОТ в концентрации 3 % полностью подавлял рост золотистого стафилококка, а наиболее выраженное частично бактерицидное действие отмечено при использовании 2 %-ной концентрации раствора.

При исследовании влияния стабилизатора ПАВ АОТ на клинические штаммы *E. coli* было установлено, что концентрации в диапазоне от 3 до 1 % оказывали частично бактерицидное действие согласно показателям КОЕ, а показатели выживаемости бактерий при действии 1 %-ного раствора АОТ достоверно не отличались от контрольных значений.

Таким образом, было установлено, что водные дисперсии наночастиц серебра и меди превосходят по выраженности антимикробного действия водные

диализованные дисперсии этих же металлов в отношении стандартных и клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli*. При сравнении эффективности действия водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди выявляется приоритет в антимикробной активности наночастиц меди в составе водной дисперсии на клинические штаммы *S. aureus*. Антибактериальное действие наночастиц серебра в составе водной и водной диализованной дисперсий по отношению к клиническим штаммам *E. coli* существенно превосходит аналогичный эффект соответствующих концентраций водной и водной диализованной дисперсий меди.

Выявлен микробиоцидный эффект при действии композиционных смесей водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди в отношении стандартных и клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli*. Установлено, что бактерицидный эффект при действии водной дисперсии наночастиц меди и композиционной смеси наночастиц металлов в отношении клинических штаммов *S. aureus* проявляется в более широком диапазоне концентраций (от 3 % до 0,5 %), чем при действии водной дисперсии наночастиц серебра (от 3 % до 1 %).

При действии на клинические штаммы *E. coli* водных дисперсий наночастиц серебра и меди, а также их композиционной смеси самым эффективным является водная дисперсия серебра. Выраженность антибактериальной активности исследуемых концентраций водных дисперсий (0,5 %, 0,25 % и 0,125 %) убывает в ряду $AgW \rightarrow AgW+CuW \rightarrow CuW$.

Полученные результаты согласуются с данными, представленными в работах [10, 13, 55, 134, 166, 172, 182, 186], в которых отмечены высокая антимикробная активность наночастиц металлов переходной группы, в том числе серебра и меди, а также дозозависимый эффект выраженности их антибактериального действия [63, 152, 174, 193, 210].

Аналогичные результаты получены и в исследовании А.А. Рахметовой [94], которая наблюдала более выраженную задержку роста при действии наночастиц меди в отношении грамположительных бактериальных клеток (*S. albus*) по сравнению с грамотрицательными (*E. coli* AB1 157). Вероятно, это

связано с особенностями метаболической активности клеток грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и их различной устойчивостью к действию ионов металлов, в частности меди.

Бактериостатический и бактерицидный эффекты ионов серебра связывают со степенью тяжести поражения клетки. Первоначально серебро сорбируется клеточной оболочкой, которая выполняет защитную функцию. Клетка остается жизнеспособной, но при этом нарушаются некоторые ее функции, например, митотическая активность (бактериостатический эффект). Как только наносеребро проникает внутрь клетки, оно ингибирует ферменты дыхательной цепи, а также разобщает процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в микробных клетках, в результате чего клетка гибнет (бактерицидный эффект) [136, 197].

В отношении антибактериального действия серебра на микроорганизмы известно, что этот металл инактивирует белки клеточной стенки путём связывания с серосодержащими соединениями. Кроме того, один из главных бактерицидных механизмов ионов серебра связан с взаимодействием с рибосомой и последующим ингибированием экспрессии белков, необходимых для производства АТФ [95, 148, 208].

Механизм действия ионов меди на живую клетку описан в работе В.С.Лебедева [72]. Автор установил, что при взаимодействии Cu^{2+} с белками плазматической мембраны кишечной палочки происходит разрыв их дисульфидных связей, в результате чего открываются каналы неспецифической проводимости для катионов. Все это сопровождается изменениями в барьерной и энергетической функциях клеточной мембраны, что приводит вначале к стагнации процессов жизнедеятельности клетки, а затем и к её гибели. Данный механизм подтверждается и другими исследованиями. Так, доказано, что взаимодействие ионов меди с аминокислотами и SH-группами ферментов является причиной нарушения синтеза белка и нуклеиновых.

Механизмы биоцидной активности металлических наноструктур J.Diaz-Visurraga et al. [148] обобщают, выделяя основные:

- накопление наночастиц металлов бактериальной мембраной и освобождение их ионов, сопровождающееся изменением проницаемости с постепенным освобождением липополисахаридов, мембранных белков и внутриклеточных факторов;

- поглощение наночастиц и ионов металлов (их перемещение и усвоение) клеткой с последующими нарушениями внутриклеточной продукции АТФ и репликации ДНК;

- генерацию активных форм кислорода при участии наночастиц металла и их ионов с последующим окислительным повреждением клеточных структур.

Согласно литературным данным [1, 82, 97, 108, 127, 151, 196], биологический эффект металлических наночастиц определяется их формой, структурой и химическим составом, однако важная роль принадлежит сохранению наноразмерности, что достигается при использовании стабилизаторов. Поэтому в нашем исследовании для стабилизации наночастиц серебра и меди в составе водных и водных диализованных растворов применяли поверхностно активное вещество АОТ.

Установлено антимикробное действие стабилизатора ПАВ АОТ в отношении стандартных и клинических штаммов исследуемых микроорганизмов, однако в изучаемых водных дисперсиях наночастиц серебра и меди АОТ присутствует в более низких концентрациях, что исключает его влияние на антимикробную активность водных растворов наночастиц металлов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что грамположительные бактерии проявили большую чувствительность по сравнению с грамотрицательными как к наночастицам металлов в составе водных и водных диализованных дисперсий, их композиционным смесям, так и стабилизатору ПАВ АОТ. Низкая чувствительность стандартного и клинических штаммов *E. coli* к действию дисперсий металлических наночастиц, вероятно, связана с особенностями строения клеточной стенки и наличием гидрофобной липополисахаридной оболочки, наличие которой затрудняет проникновение наноструктур в периплазматическое пространство.

3.3 Влияние водных дисперсий наночастиц металлов на адгезивную активность грамположительных и грамотрицательных бактерий

Для оценки влияния металлических наночастиц в составе водных дисперсий на адгезивную активность микроорганизмов определяли основные показатели адгезии – средний показатель адгезии (СПА), коэффициент адгезии (КА) и индекс адгезии микроорганизма (ИАМ). Для определения КА из числа учитываемых эритроцитов подсчитывали процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности микроорганизмы. СПА определяли по среднему числу микроорганизмов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита, при подсчете не менее 25 эритроцитов.

Затем был подсчитан ИАМ, который представляет собой среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе. Расчет ИАМ проводили по формуле:

$$ИАМ = \frac{СПА}{КА} \times 100\% \quad (3)$$

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

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

В исследованиях по влиянию водных дисперсий наночастиц металлов на адгезивные свойства использовали стандартный и клинические штаммы *S. aureus* и *E. coli*. Для обработки микробных клеток использовали субингибирующие концентрации водных дисперсий наночастиц металлов (0,25 %). Полученные результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Значения индекса адгезии микроорганизмов исследуемых бактерий при действии дисперсий наночастиц металлов

Исследуемые микроорганизмы	Значения ИАМ				
	AgW	AgWD	CuW	CuWD	контроль
<i>S. aureus</i> 209P	1,22±0,24*	1,32±0,24*	1,48±0,22*	1,3±0,12*	2,2±0,26
<i>S. aureus</i> № 84	1,34±0,16*	1,72±0,2*	1,02±0,24*	1,22±0,28*	2,8±0,17
<i>S. aureus</i> № 97	1,32±0,2*	1,65±0,16*	1,24±0,17*	1,18±0,18*	2,94±0,43
<i>S. aureus</i> № 273	1,68±0,12*	1,52±0,14*	1,7±0,16*	1,44±0,2*	3,57±0,46
<i>S. aureus</i> № 275	1,58±0,21*	1,46±0,22*	1,32±0,2*	1,16±0,16*	2,64±0,63
<i>E. coli</i> 113-13	1,43±0,32*	1,62±0,12*	1,86±0,22	1,79±0,28	2,1±0,34
<i>E. coli</i> № 227	1,8±0,63*	1,56±0,63*	1,47±0,16*	1,94±0,34*	5,04±1,14
<i>E. coli</i> № 232	1,16±0,37*	1,4±0,48*	1,65±0,54*	2,32±0,7*	6,88±0,81
<i>E. coli</i> № 245	2,4±0,8*	1,44±0,49*	1,7±0,32*	1,72±0,32*	7,0±0,93
<i>E. coli</i> № 337	1,21±0,41*	1,36±0,55*	1,84±0,38*	1,3±0,14*	5,84±1,04

Примечание – * наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю

Стандартный штамм *S. aureus* 209 P по показателям ИАМ характеризовался как низкоадгезивный, а клинические штаммы *S. aureus* № 84, № 97, № 273, № 275 – как среднеадгезивные. Обработка клеток золотистого стафилококка субингибирующими концентрациями водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди приводила к снижению показателей ИАМ до неадгезивного уровня вне зависимости от вида металлических наноструктур.

При оценке адгезивной способности грамотрицательных бактерий было установлено, что стандартный штамм *E. coli*, согласно значениям ИАМ, характеризовался низким уровнем адгезии, а все клинические штаммы (*E. coli* №№ 227, 232, 245, 337) обладали высокой адгезивной активностью (значения ИАМ 5,04 – 7).

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. Так, по показателям ИАМ стандартный и все клинические штаммы *E. coli* характеризовались как неадгезивные.

Снижение адгезивной активности стандартных и клинических штаммов *S. aureus*, вероятно, связано с блокировкой наночастицами серебра и меди поверхностных структур микробных клеток, необходимых для связи с фибронектином эритроцитов [121]. Снижение адгезивных свойств грамотрицательных бактерий происходит за счет деструктивного действия наночастиц металлов в отношении фимбриальных структур бактерий, обеспечивающих адгезию [21, 99, 113].

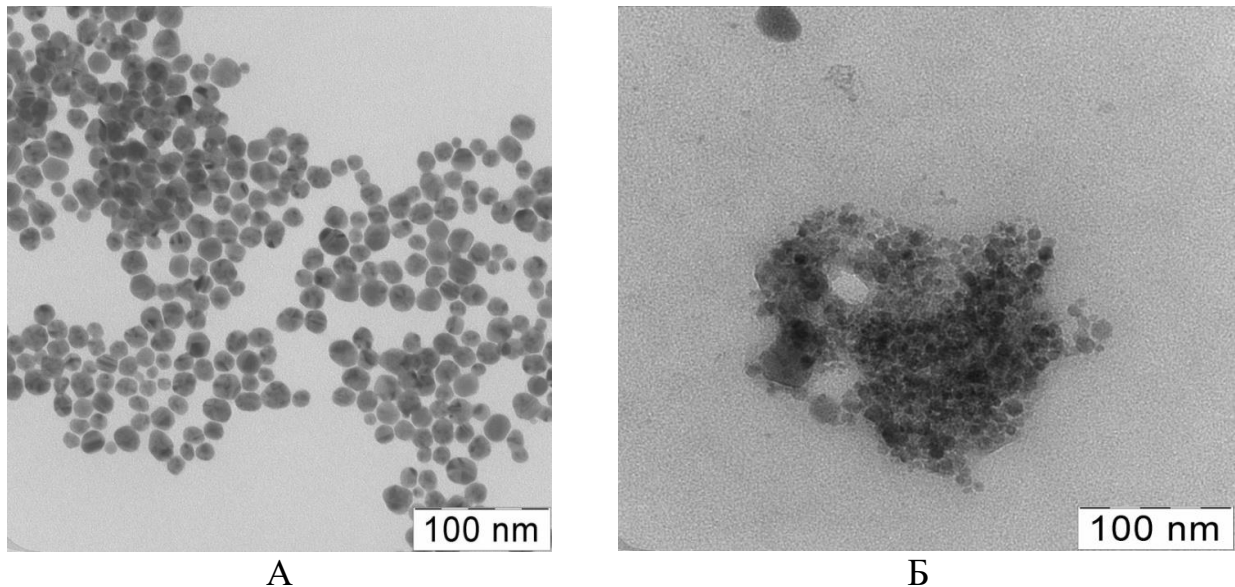
Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать возможности использования препаратов, содержащих металлические наноструктуры, для местного лечения и профилактики заболеваний, вызванных чувствительными микроорганизмами.

3.4 Изучение размерности наночастиц металлов в составе водных и водных диализованных дисперсий в процессе хранения

Для подтверждения сохранения стабильности наночастиц металлов в водных дисперсиях в динамике использовали электронную микроскопию. Размерность, состояние поверхности наночастиц в водных дисперсиях определяли по микрофотографиям.

Было установлено, что исходные водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов имели сходные качественные показатели. На рисунке 2 А представлена микрофотография водной дисперсии наночастиц серебра. Наночастицы серебра имели сферическую форму, средний размер 9 ± 2 нм, без образования ассоциатов.

На микрофотографии водной дисперсии наночастиц меди (рисунок 2 Б) наночастицы имели приблизительно сферическую форму, средний размер которых не превышал 15 нм [55].



А
Б
Рисунок 2 – Электронная микрофотография водной дисперсии наночастиц серебра (А) и меди (Б), (Егорова Е.М., 2011).

Для дальнейших исследований использовали водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди, срок хранения которых превышал 12 месяцев.

Полученные результаты показали, что наночастицы серебра и меди в процессе хранения в виде водных и водных диализованных дисперсий имели псевдосферическую форму, неоднородные размеры и образовывали конгломераты. Средний диаметр наночастиц серебра в водной дисперсии составлял $99,4 \pm 25$ нм, а в водной диализованной – $58,9 \pm 19,6$ нм (рисунок 3).

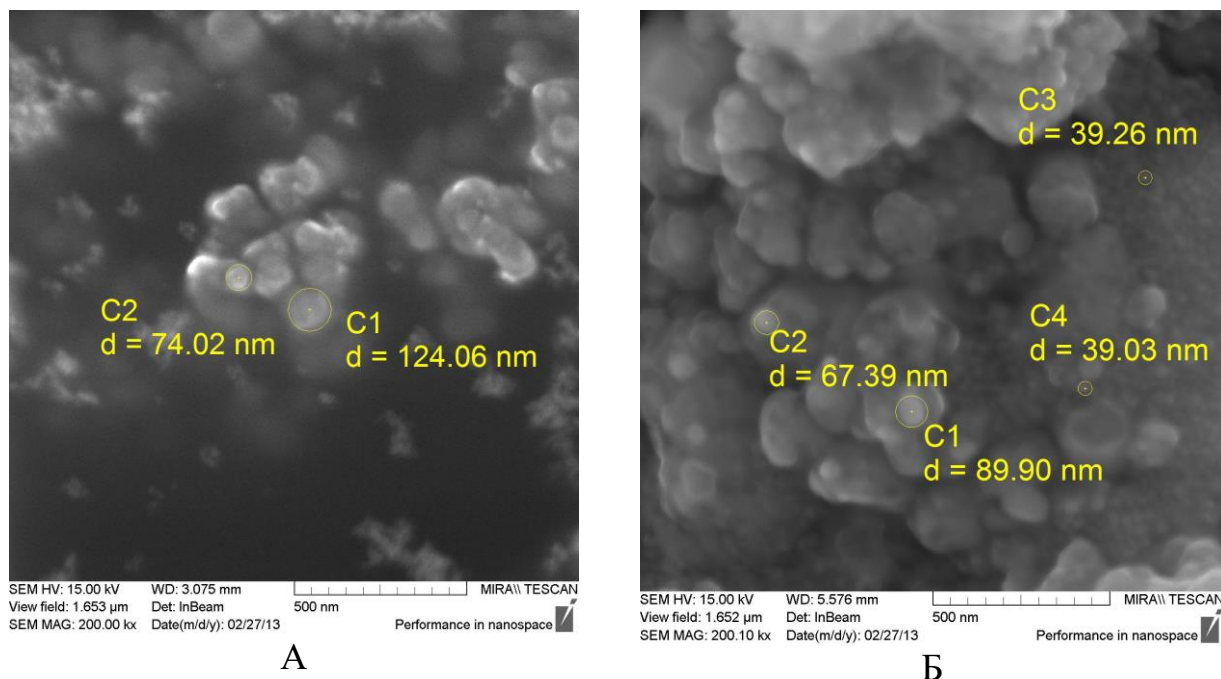


Рисунок 3 – Электронная микрофотография водной (А) и водной диализованной (Б) дисперсии серебра после хранения

Аналогичные результаты были получены при исследовании наночастиц меди – их средние размеры в водной дисперсии составляли $28,9 \pm 7,8$ нм, а в водной диализованной – $66,5 \pm 10,7$ (рисунок 4).

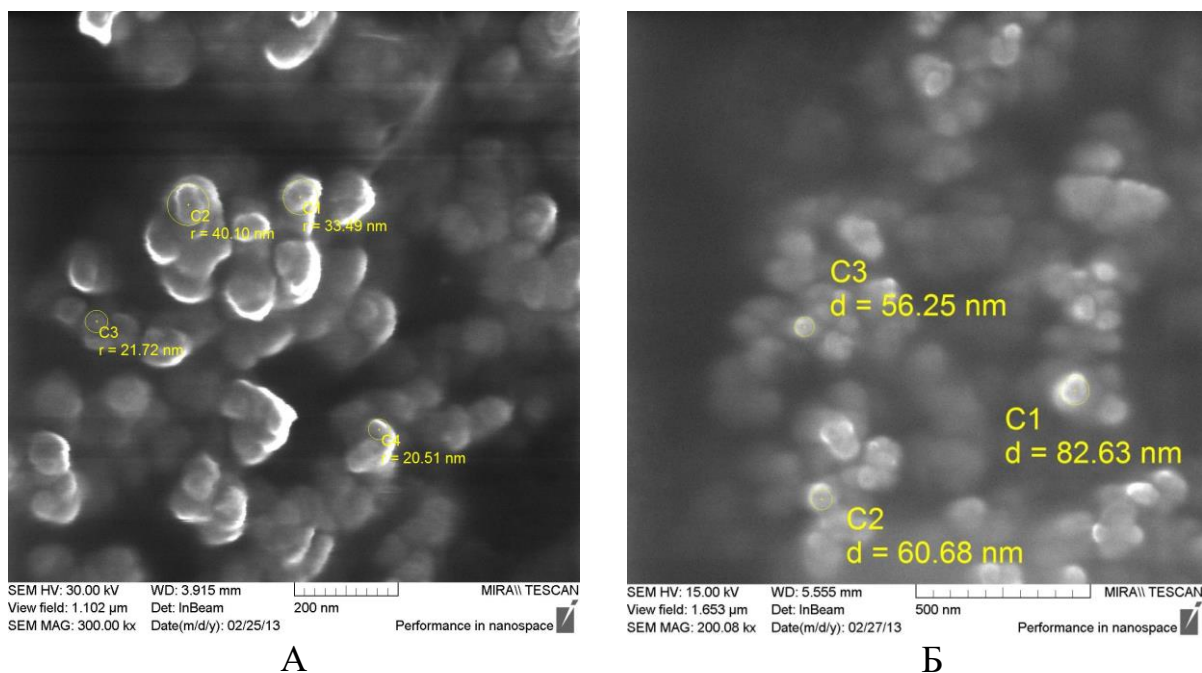


Рисунок 4 – Электронная микрофотография водной (А) и водной диализованной (Б) дисперсии меди после хранения.

Анализ полученных результатов показал, что все исследуемые водные дисперсии наночастиц металлов после хранения в течение 12 месяцев сохраняли наноструктурные размеры (рисунок 5).

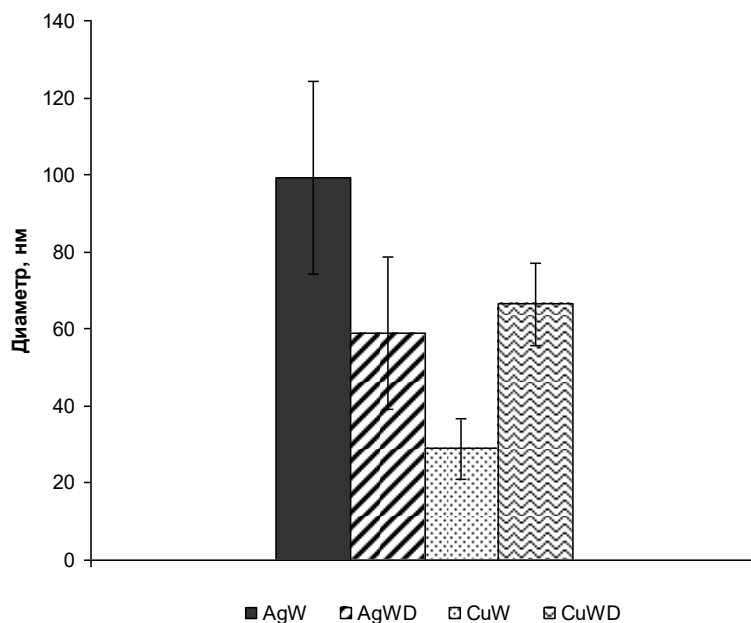


Рисунок 5 – Распределение наночастиц металлов в составе водных дисперсий по размерам.

Стабилизация наночастиц серебра ПАВ АОТ приводила к сохранению меньших размеров наночастиц в водных диализованных дисперсиях по сравнению с водными. Стабилизация водной дисперсии меди ПАВ АОТ была более эффективной по сравнению с водной диализованной дисперсией, т.к. в первом случае размеры наночастиц меди были в среднем в 2 раза меньше по сравнению с диализованной дисперсией.

Таким образом, полученные результаты отражают медленно текущие процессы агрегации наночастиц металлов.

3.5 Определение острой токсичности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов на биотест-объекте *Daphnia magna* Straus

Для оценки возможности дальнейшего использования водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов определяли их острое токсическое действие по смертности *Daphnia magna* Straus за 48 часов экспозиции.

Через 48 часов экспозиции подсчитывали количество выживших и погибших особей во всех опытных и контрольных растворах соединений. На основании полученных результатов рассчитывали процент погибших дафний по отношению к контролю (таблица 15).

Таблица 15 – Выживаемость дафний в опытных образцах исследуемых наночастиц металлов (экспозиция 48 ч.)

Лабораторные шифры опытных образцов	Показатель гибели дафний А, %						
	концентрации соединений, %						контроль
	3	2	1	0,5	0,25	0,125	
AgW	100	80	50	20	10	0	0
AgWD	100	50	0	0	0	0	0
CuW	100	90	50	40	20	20	0
CuWD	100	80	50	20	20	10	0
AOT	100	100	100	100	100	80	0

В экспериментах по определению острого токсического действия опытных образцов наночастиц металлов устанавливали:

1. Летальную концентрацию, вызывающую гибель 100 % тест-организмов (ЛК₁₀₀₋₄₈).
2. Среднюю летальную концентрацию, вызывающую гибель 50 % и более тест-организмов (ЛК₅₀₋₄₈).
3. Безвредную концентрацию, вызывающую гибель не более 10 % тест-объектов (БК₁₀₋₄₈).

4. Минимальную безвредную концентрацию соединений, при которой не наблюдалась гибель организмов (БК₀₋₄₈).

На основании полученных данных были определены показатели острой токсичности для исследуемых водных дисперсий наночастиц металлов, которые представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Показатели острой токсичности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов (%)

Краткое название соединения	ЛК ₁₀₀₋₄₈	ЛК ₅₀₋₄₈	БК ₁₀₋₄₈	БК ₀₋₄₈
AgW	3	1-2	0,25	0,125
AgWD	3	2	-	0,125-1
CuW	3	1-2	-	-
CuWD	3	1-2	0,125	-
AOT	0,25-3	0,125	-	-

В результате проведенных исследований было установлено, что водная и водная диализованная дисперсии наночастиц серебра характеризовались различным уровнем токсичности в отношении тест-объектов, который зависел от количественного содержания стабилизатора в дисперсии. Наименьшую токсичность проявляла водная диализованная дисперсия наночастиц серебра, для которого были определены показатели БК₀₋₄₈ в диапазоне 1 %-0,125 %.

Сходные результаты наблюдались и при оценке показателей острой токсичности водной и водной диализованной дисперсии наночастиц меди, однако токсичность этих дисперсий была выше по сравнению с дисперсиями наночастиц серебра.

Наиболее высокой токсичностью характеризовался стабилизатор ПАВ АОТ, т.к. даже его невысокие концентрации вызывали гибель большинства исследуемых тест-объектов.

Согласно полученным результатам все исследуемые образцы были разделены на 3 группы:

1. Высокотоксичные соединения, для которых не представляло возможным определить значения BK_{10-48} и BK_{0-48} (CuW и AOT).

2. Малотоксичные соединения, которые характеризовались низкими значениями BK_{10-48} и BK_{0-48} (AgW и CuWD).

3. Нетоксичные соединения, которые характеризовались высокими значениями BK_{10-48} и BK_{0-48} (AgWD).

Таким образом, по показателям острой токсичности наиболее безопасным препаратом явилась водная диализованная дисперсия наночастиц серебра в диапазоне концентраций 1 %-0,125 %.

Глава 4 Изучение антимикробной фотодинамической активности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов

При фотодинамическом воздействии важным условием генерации активных форм кислорода и свободных радикалов является совпадение максимума испускания источника излучения и максимума поглощения фотосенсибилизатора [32, 83, 111]. Для прогнозирования эффективности фотодинамического воздействия с использованием исследуемых образцов наночастиц измеряли оптическую плотность их водных суспензий в рабочих концентрациях.

Установлено, что дисперсия наночастиц серебра AgW имеет максимум поглощения в области 410 нм (0,707 отн.ед.). При этом оптическая плотность при длине волны 405 нм составила 0,702 отн. ед (рисунок 6).

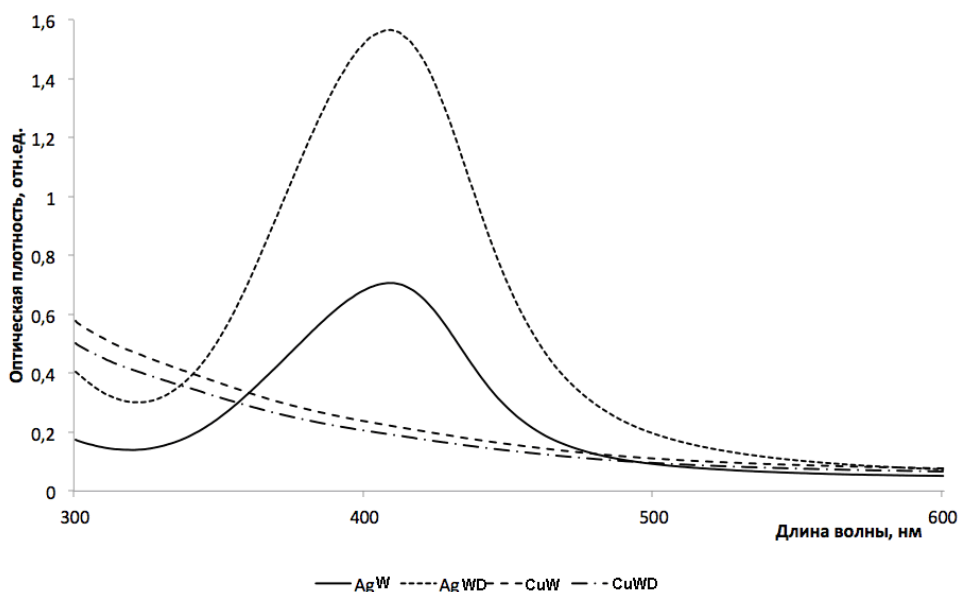


Рисунок 6 – Спектры оптической плотности исследуемых наночастиц.

Измерения дисперсии наночастиц серебра AgWD показали, что данный образец наночастиц имеет максимум поглощения в спектральном регионе 405-410 нм (1,557-1,564 отн. ед.). Оптическая плотность дисперсии при длине волны возбуждения 405 нм была выше, чем в предыдущем случае, и составила 1,557 отн. ед. Полученные показатели оптической плотности соответствуют паспортным данным фирмы-разработчика.

Спектральный анализ дисперсии наночастиц меди CuW выявил довольно широкую область с высоким поглощением от 300 до 400 нм. Оптическая плотность дисперсии этого образца наночастиц при длине волны 405 нм составила 0,228 отн. ед. Установлено, что наночастицы меди CuWD имеют аналогичный спектр с оптической плотностью раствора равной 0,197 отн. ед. при 405 нм.

Проведенные исследования показали, что использование выбранных образцов наночастиц в сочетании с синим (405 нм) светодиодным излучением может быть перспективным для антимикробного фотодинамического воздействия.

На следующем этапе исследовали действие синего (405 нм) светодиодного излучения на клетки стандартного штамма *S. aureus* 209 P. Показано, что фотовоздействие синим светом не вызывало существенного сокращения численности исследованного микроорганизма (рисунок 7, А). Так воздействие в течение 5 мин приводило к снижению КОЕ на 9 % относительно контроля, а время облучения 10 мин обуславливало сокращение показателя КОЕ на 22 %. Действие синего излучения в течение 30 мин сокращало относительную численность исследованных бактерий на 39 %.

Обработка клеток *S. aureus* 209 P водной дисперсией наночастиц серебра AgW вызывала существенное усиление действия светодиодного излучения. После 5 мин экспозиции численность бактерий сокращалась на 41 %, после 15 мин – на 88 %, после 30 мин – на 97 % (рисунок 7 А).

Клинический штамм золотистого стафилококка (MRSA) демонстрировал большую восприимчивость к действию светодиодного синего излучения (рисунок 7 Б). Экспозиция света в течение 10-15 мин приводила к сокращению численности популяции бактерий на 35-47 % по сравнению с контролем. Облучение длительностью 30 мин вызывало уменьшение числа КОЕ на 58 %.

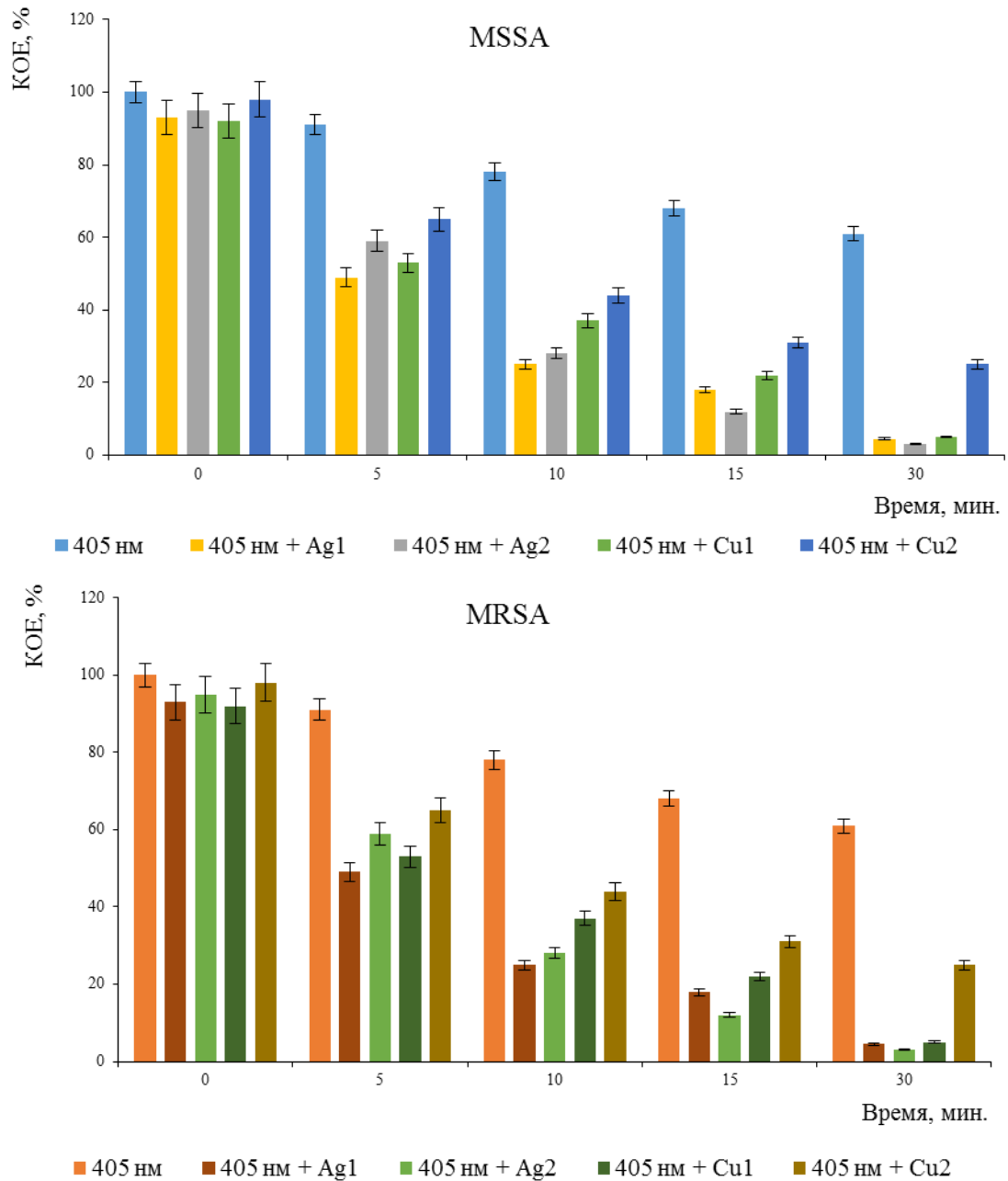


Рисунок 7 – Влияние синего (405 нм) светодиодного излучения и наночастиц на численность микроорганизмов.

Использование водной диализованной дисперсии наночастиц серебра AgWD обеспечивало более выраженное подавляющее действие на клетки *S. aureus* 209 P в течение первых 5-10 мин облучения: уменьшение числа КОЕ отмечено на 51-75 %. При дальнейшем увеличении времени облучения снижение численности отмечено на 82 % после 15 мин и на 96 % – после 30 мин (рисунки 7 А, 8).

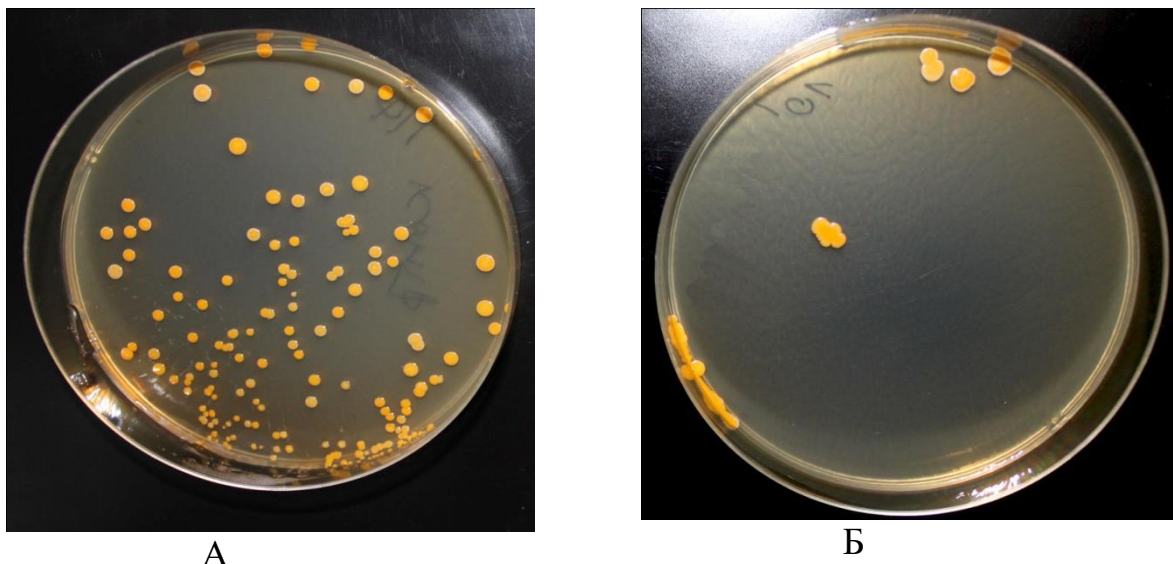


Рисунок 8 – Показатели КОЕ *S. aureus* 209 P: А – контроль; Б – после обработки наночастицами AgW и облучении синим светом 15 мин.

Сходная динамика изменения численности бактерий при использовании двух образцов водных дисперсий наночастиц серебра и облучении светодиодным синим излучением отмечена для метициллинрезистентного штамма *S. aureus*. При варьировании времени облучения от 5 до 30 мин снижение числа КОЕ происходило в среднем на 60-98 % (рисунок 8 Б).

Необходимо отметить, что сокращение числа микроорганизмов двух исследованных штаммов, клетки которых были обработаны наночастицами серебра и подвергнуты облучению в течение 15-30 мин, не имело достоверных различий друг с другом. Незначительное усиление эффекта (2-3 %) в случае с образцом наночастиц AgW можно объяснить более высоким содержанием ПАВ АОТ, который обладает незначительным токсическим действием.

На следующем этапе было изучено действие водных дисперсий наночастиц меди CuW на выживаемость *S. aureus* 209 P. Установлено, что данные наночастицы усиливают действие синего (405 нм) излучения. Снижение КОЕ после 5 мин воздействия отмечено на 47 %, после 30 мин – на 95 %. Образец наночастиц меди CuWD обладал менее выраженными фотодинамическими свойствами. Уменьшение численность *S. aureus* 209 P происходило на 35-75 % после 5-30 мин облучения синим светом.

Для клинического штамма *S. aureus* эффект усиления фотодинамического действия синего излучения водными дисперсиями наночастиц меди был более выражен. Сокращение численности КОЕ бактерий в случае использования образца CuW показано на 44 % после 5 мин облучения, на 71 % – после 10 мин, на 81 % – после 15 мин и на 96 % – после 30 мин. Использование образца водной дисперсии наночастиц меди CuWD также вызывало гибель бактериальной популяции. Снижение численности микроорганизмов происходило на 77 % после 15 мин облучения синим светом и на 84 % – после 30 мин.

Содержание стабилизатора АОТ в образце водной дисперсии наночастиц меди в 2 раза выше, чем в образце водной диализованной дисперсии, с этим, вероятно, и связано более эффективное снижение числа КОЕ исследованных микроорганизмов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что наибольшую фотодинамическую активность в отношении исследованных штаммов проявляла водная диализованная дисперсия наночастиц серебра образца AgWD, причем наиболее чувствительным к ним оказался метициллинрезистентный клинический штамм *S. aureus*. Поскольку по данным производителя в соответствии с паспортом качества срок годности наночастиц составляет до 2-х лет с даты изготовления, то полученные нами результаты позволяют рассматривать водные дисперсии наночастиц серебра и меди в качестве перспективных фотосенсибилизаторов для усиления эффекта действия синего излучения на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний при проведении антимикробной фотодинамической терапии.

Глава 5 Влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов на процесс регенерации экспериментальной гнойной раны

Все животные, участвующие в эксперименте, были разделены на 6 групп по 10 животных в каждой:

- группа № 1 (контроль 1) – раны не обрабатывали;
- группа № 2 (контроль 2) – раны обрабатывали 0,5%-ным раствором хлоргексидина;
- группа № 3 – раны обрабатывали 1%-ной водной дисперсией наночастиц серебра;
- группа № 4 – раны обрабатывали 1%-ной водной диализованной дисперсией наночастиц серебра;
- группа № 5 – раны обрабатывали 1%-ной водной дисперсией наночастиц меди;
- группа № 6 – раны обрабатывали 1%-ной водной диализованной дисперсией наночастиц меди.

После моделирования гнойной раны все экспериментальные животные выжили. Динамика изменения площади экспериментальных полнослойных гнойных ран представлена на рисунке 9.

Через 48 часов, согласно методике Толстых (1976) [42], после проведения операции раны животных выглядели следующим образом: наблюдались выраженная инфильтрация и гиперемия краев раны и близлежащих тканей, в ране отмечалось обильное гнойное содержимое, на дне раны выявлены участки некроза и налет фибрина (рисунок 10). Площадь раны составляла $225 \pm 0,8$ мм².

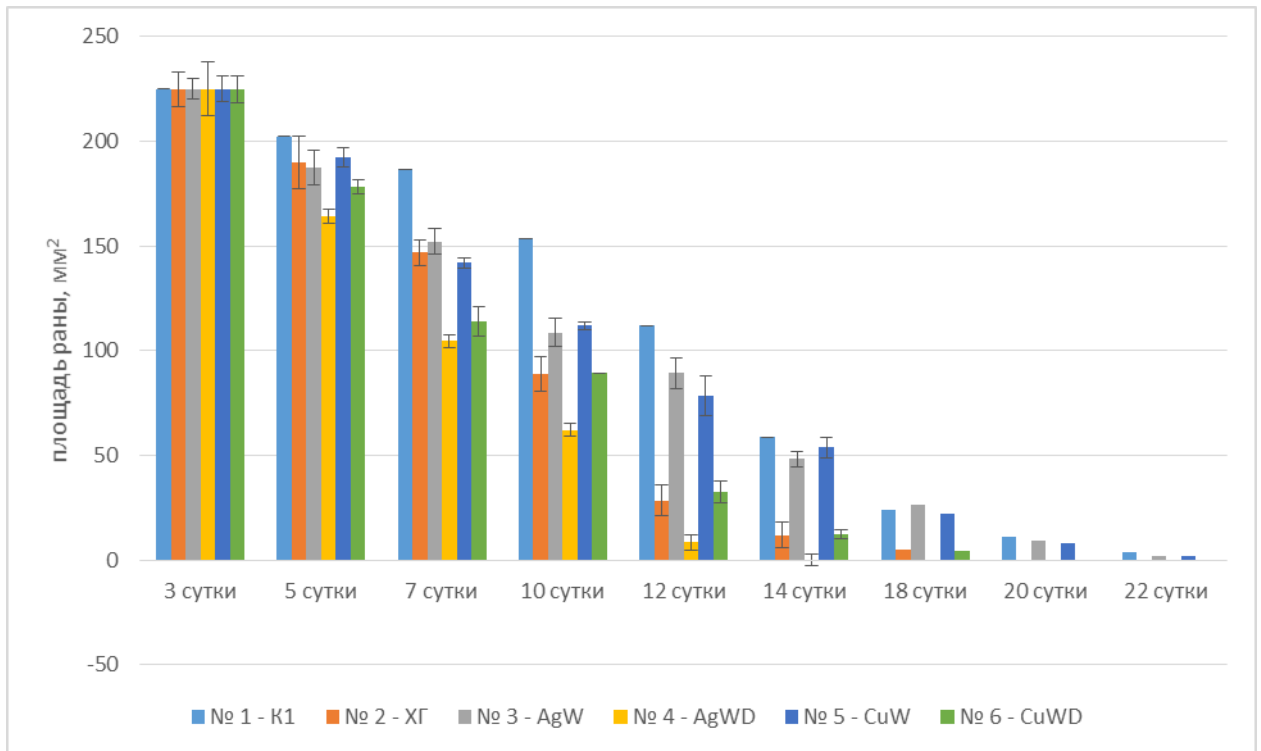


Рисунок 9 – Динамика изменения площади экспериментальных гнойных ран.

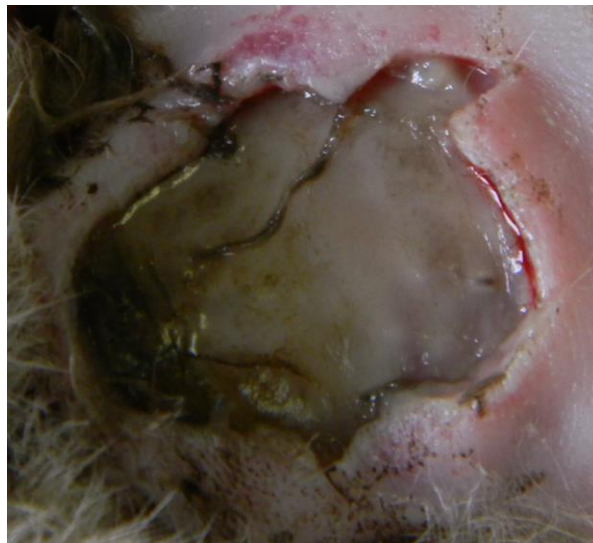


Рисунок 10 – Исходная полнослойная гнойная рана.

На 3-и сутки после начала санации существенных изменений в течение раневого процесса, как в опытных, так и в контрольных группах животных не происходило: поверхность раны была покрыта фибрином, а по периферии наблюдалось появление грануляционной ткани. Происходило незначительное сокращение площади ран во всех группах, наиболее выраженное в опытной группе животных, раны которых обрабатывали водной дисперсией наночастиц

серебра: в группе № 1 площадь раны составила $202 \pm 8,12 \text{ мм}^2$, в группе № 2 – $189,8 \pm 12,4 \text{ мм}^2$, в группе № 3 – $164,24 \pm 8,32$, в группе № 4 – $187,4 \pm 6,32 \text{ мм}^2$, в группе № 5 – $178,2 \pm 6,18 \text{ мм}^2$, а группе № 6 – $192,46 \pm 7,34 \text{ мм}^2$.

На 5-е сутки от начала санации во всех опытных группах животных, а также в контрольной группе № 2 наблюдалось полное исчезновение перифокального отека, в контрольной группе № 1 мягкие ткани в зоне раны сохраняли отечность, по периферии ран были выражены некротические изменения. В ранах животных контрольной группы № 2 и опытных групп № 3 и № 5 наблюдалась выраженная краевая эпителизация, что приводило к достоверному уменьшению площади ран по сравнению с контрольной группой № 1, площадь раны в которой составила $186,6 \pm 4,86 \text{ мм}^2$; в группе № 2 площадь раны была $146,8 \pm 8,4 \text{ мм}^2$; в группе № 3 – $104,62 \pm 6,8 \text{ мм}^2$, в группе № 4 – $152,22 \pm 6,2 \text{ мм}^2$, в группе № 5 – $114,02 \pm 3,8 \text{ мм}^2$, а группе № 6 – $142,08 \pm 7,6 \text{ мм}^2$ (рисунок 11).

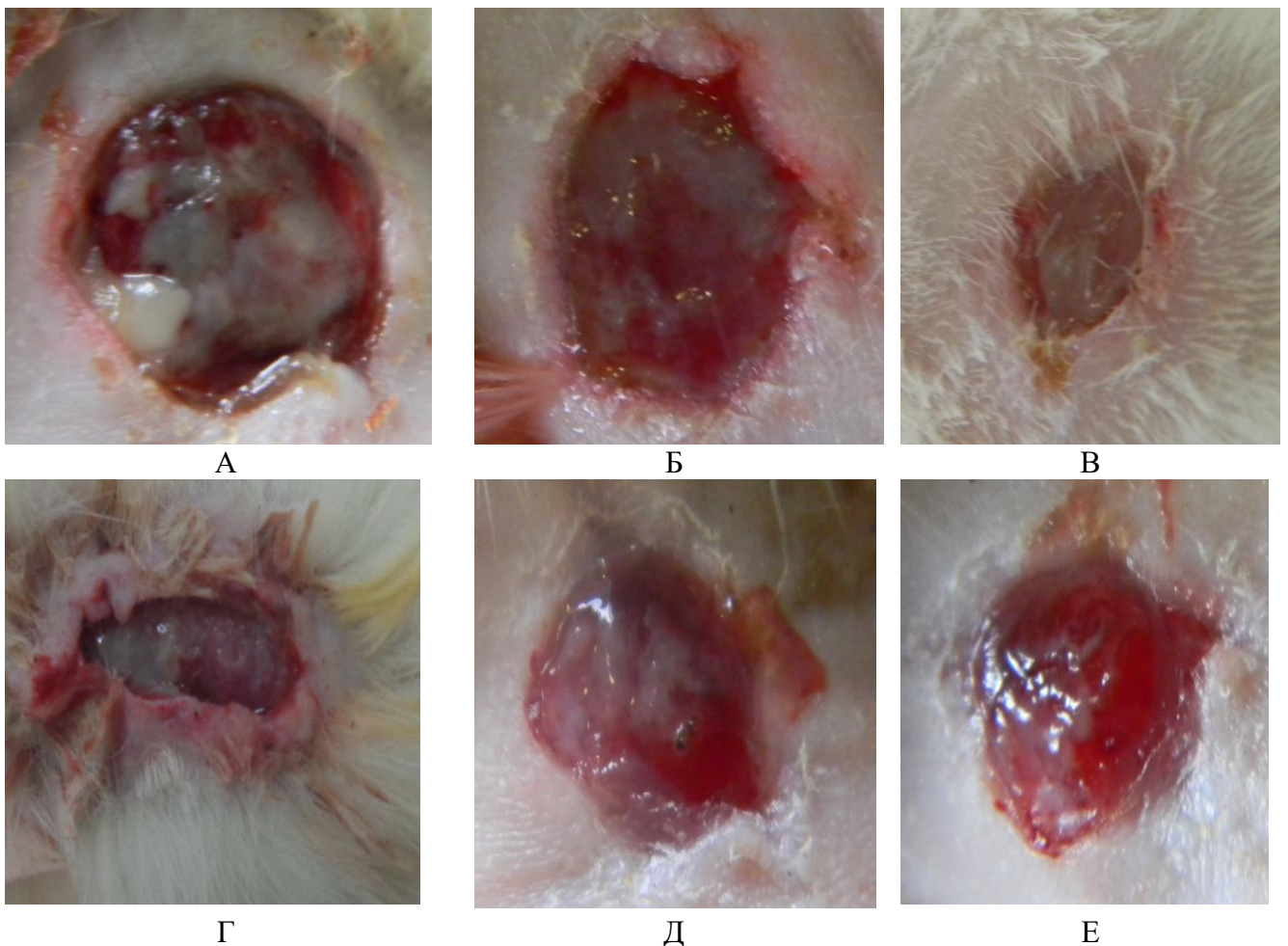


Рисунок 11 – 5-е сутки после начала санации:

А - К1, Б – ХГ, В – AgW, Г – AgWD, Д – CuW, Е – CuWD.

К 7 суткам от начала санации наблюдалось достоверное сокращение площади экспериментальных ран во всех группах животных: в группе № 1 площадь раны составила $153,65 \pm 12,74$ мм², в группе № 2 – $89,0 \pm 3,57$ мм², в группе № 3 – $62,25 \pm 3,06$, в группе № 4 – $108,60 \pm 3,00$ мм², в группе № 5 – $89,22 \pm 2,88$ мм², а группе № 6 – $112,0 \pm 3,75$ мм². Кроме того, в экспериментальных группах животных, раны которых обрабатывали водными и водными диализованными дисперсиями наночастиц серебра и меди, а также в контрольной группе 2 происходило очищение раневой поверхности от гнойного содержимого, однако края ран оставались гиперемированы.

На 10-е сутки от начала санации площадь ран контрольной группы животных № 1 составила $112,4 \pm 6,22$ мм². Наименьшая площадь ран наблюдалась у экспериментальной группы животных № 3 ($8,62 \pm 1,78$ мм²), раны которых обрабатывали водной дисперсией наночастиц серебра. При обработке ран раствором хлоргексидина и водной дисперсией наночастиц меди происходило значительное уменьшение площади ран $28,45 \pm 4,67$ мм² и $32,8 \pm 4,78$ мм² соответственно по сравнению с контролем. Из всех используемых для обработки ран препаратов менее эффективными оказались водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди, так как под их воздействием эпителизация ран происходила не столь активно ($89,22 \pm 2,53$ мм² и $78,4 \pm 9,32$ мм² соответственно), как в контрольных группах (рисунок 12).

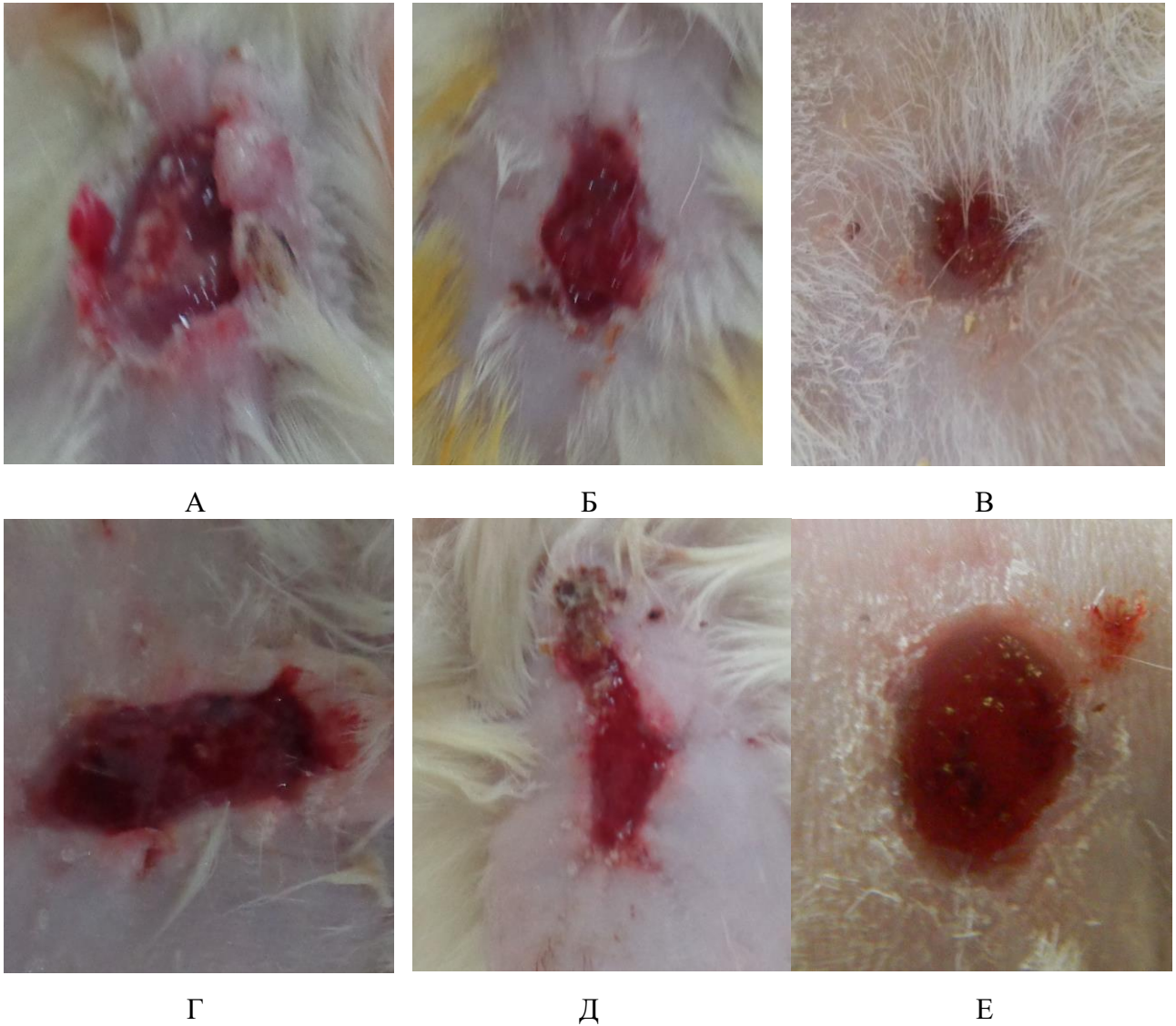


Рисунок 12 – 10-е сутки после начала санации:

А - К1, Б – ХГ, В – AgW, Г – AgWD, Д – CuW, Е – CuWD.

К 12-м суткам от начала эксперимента происходило полное заживление экспериментальных гнойных ран животных опытной группы № 3 с образованием нежного рубца. В контрольной группе № 2 и опытной группе № 5 происходило уменьшение площади ран по сравнению с контролем в 5 раз и их размеры составили $12,06 \pm 3,28 \text{ мм}^2$ и $12,43 \pm 2,22 \text{ мм}^2$ соответственно. Заживление ран опытных групп животных № 4 и № 6 происходило медленнее, и их площадь составила $48,2 \pm 7,22 \text{ мм}^2$ и $53,76 \pm 5,28 \text{ мм}^2$ соответственно. Достоверное уменьшение раневой поверхности наблюдалось и в контрольной группе

животных № 1 (площадь ран составила $58,7 \pm 6,4 \text{ мм}^2$). Кроме того, происходило очищение ран от гнойного содержимого (рисунок 13).

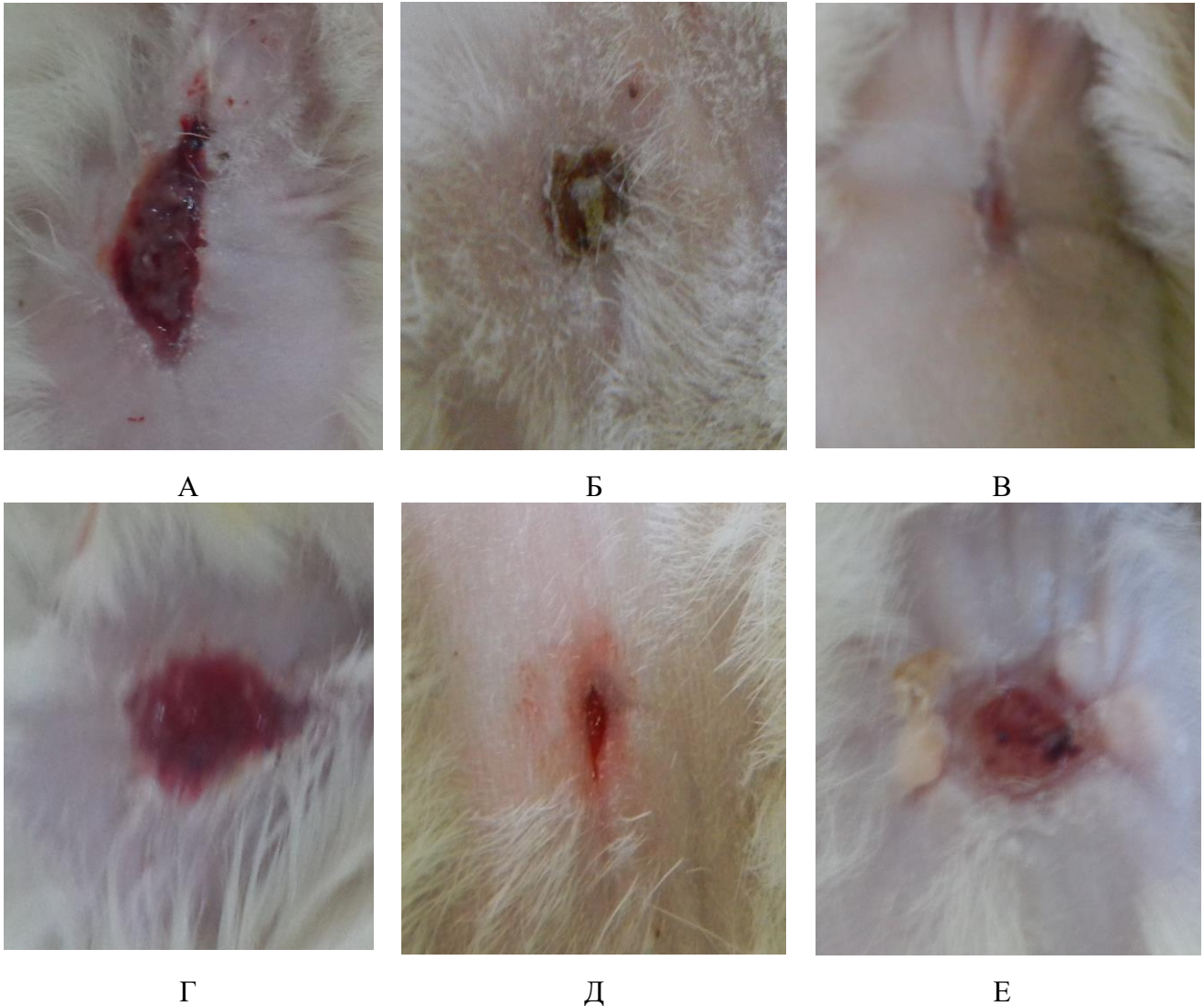


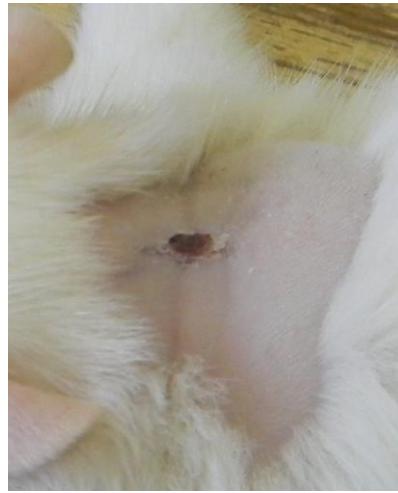
Рисунок 13 – 12-е сутки после начала санации:

А - K1, Б – ХГ, В – AgW, Г – AgWD, Д – CuW, Е – CuWD.

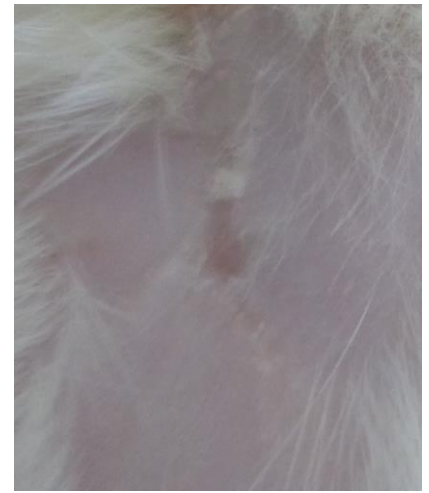
Полное заживление ран животных контрольной группы № 2 и опытной группы № 5 происходило на 18 сутки, а в контрольной группе № 1 и опытных группах № 4 и № 6 – на 22 сутки от начала санации с образованием соединительнотканного рубца (рисунок 14).



А



Б



В



Г



Д



Е

Рисунок 14 – 18-е сутки после начала санации:

А - К1, Б – ХГ, В – AgW, Г – AgWD, Д – CuW, Е – CuWD.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективное очищение экспериментальных гнойных ран происходит при их обработке водной дисперсией наночастиц серебра, что способствует сокращению сроков заживления ран в 1,8 раз по сравнению с контролем. Меньшая эффективность водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди по сравнению с водными, вероятно, связана с более высоким содержанием в их составе стабилизатора ПАВ АОТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время борьба с устойчивостью микроорганизмов к антибактериальным препаратам приобрела глобальный характер, став одной из актуальных и сложных проблем прикладной биологии, ветеринарии и медицины. До сих пор не создано ни одного антибиотика или химиотерапевтического средства, действие которого было бы эффективно в отношении всех штаммов хотя бы одного вида микроорганизмов, что свидетельствует о генетическом разнообразии его представителей и об их высокой способности приспосабливаться к внешним неблагоприятным условиям [67].

В отделениях с интенсивным использованием антимикробных препаратов частота выделения золотистого стафилококка среди всех грамположительных микроорганизмов составляет 75 %, причём более половины устойчивы к метициллину. Частота выделения культур энтеробактерий и штаммов кишечной палочки, продуцирующих β -лактамазы, составляет соответственно 70,1 % и 67,4 % [71].

Нельзя не брать во внимание повышение прямых и непрямых медицинских затрат, которые связаны с использованием дорогостоящих антибиотиков, увеличением стоимости койко-места, проведением дополнительных исследований (гематологических, биохимических, микробиологических и т.д.) и высоким риском проведения оперативного вмешательства. Антибактериальные препараты составляют значительную часть расходов – 30 % бюджета больницы из всего объёма затрат на медикаментозное обеспечение. Американским обществом микробиологов в 2000 году проведена предварительная оценка расходов на медицинское обслуживание и здравоохранение и выявлено, что ежегодные расходы на здравоохранение, связанные с лечением инфекций, вызванных резистентными возбудителями, достигают более 7 млрд. долларов [101].

Учитывая актуальность данной проблемы необходим поиск новых альтернативных средств, характеризующихся высокой антимикробной

активностью и направленных на снижение роста численности и распространения полирезистентных штаммов возбудителей инфекционных заболеваний.

Появление нанотехнологического направления в науке открыло широкие возможности для изучения уникальных свойств нанокompозитов для создания препаратов с высокой биологической активностью, новых эффективных катализаторов и сенсорных систем. Согласно данным литературы, перспективными кандидатами на создание новых бактерицидных средств считаются наноструктуры на основе серебра и меди [94]. Это и определило выбор объекта нашего исследования. Кроме того, наночастицы в виде водных растворов, стабилизированные поверхностно активными веществами, длительно сохраняют исходные размеры и концентрацию, что, в свою очередь, влияет на выраженность бактерицидного действия [8].

Проведенные нами исследования посвящены изучению антимикробных свойств водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди, полученных путем биохимического синтеза. По сравнению с другими химическими методами, биохимический синтез обладает рядом преимуществ, важных для практического применения металлических наночастиц. Во-первых, при биохимическом синтезе образование наночастиц идет в растворе на воздухе, тогда как во многих других известных вариантах для получения наночастиц необходимо создавать вакуум или атмосферу инертного газа. Это обстоятельство, а также другие особенности процедуры синтеза, позволяют избежать усложнений, необходимых в других методах (дополнительных синтезов, применения дорогостоящего или энергоемкого оборудования и др.), что значительно удешевляет конечный продукт. Во-вторых, оказывается возможным получать наночастицы, стабильные в растворе на воздухе в течение длительного времени (до нескольких лет), что весьма существенно как для исследования их свойств, так и для прикладных разработок. В то же время, известно, что в других случаях время жизни наночастиц часто не превышает нескольких дней. В-третьих, для некоторых металлов удается повысить степень превращения ионов металла в наночастицы по сравнению с достигаемой другими методами и уменьшить расход

восстановителя, что важно, опять-таки, с экономической точки зрения. В-четвертых, применение природных восстановителей делает метод биохимического синтеза более экологически безопасным [55].

В исследованиях по изучению антимикробного действия водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов в качестве экспериментальной модели использовали стандартные и клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий *S. aureus* и *E. coli*. Анализ антибиотикограмм клинических штаммов исследуемых бактерий позволил установить их множественную устойчивость как к антибиотикам группы β -лактамов, аминогликозидов, макролидов и линкозамидов, так и к химиотерапевтическим препаратам фторхинолонового ряда.

В экспериментах по изучению антимикробной активности в отношении стандартных и клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli* использовали шесть концентраций водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди (3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %), рекомендованные фирмой-разработчиком. Было установлено, что водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди характеризовались эффективным антимикробным действием. Так, в отношении стандартного и клинических штаммов *S. aureus* водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра проявляли выраженный бактерицидный эффект в диапазоне концентраций от 3 % до 1 %, а бактериостатический – в диапазоне концентраций от 0,5 % до 0,125 %. Антистафилококковая активность водной дисперсии наночастиц меди проявлялась в более широком диапазоне, т.к. концентрации от 3 % до 0,5 % обладали бактерицидным характером действия, в отличие от водной диализованной дисперсии наночастиц меди, действие которой было аналогично дисперсиям наночастиц серебра. По отношению к стандартному и клиническим штаммам *E. coli* водные и водные диализованные дисперсии наночастиц металлов проявили сходную активность и диапазон бактерицидных концентраций составил от 3 до 1 %

Оценка антимикробного действия водного раствора стабилизатора ПАВ АОТ позволила установить его невысокую активность. Так 3 %-ный раствор стабилизатора обладал бактерицидным действием в отношении *S. aureus*, а 2 %-ный – бактериостатическим действием. По отношению к изучаемым штаммам *E. coli* ПАВ АОТ проявил только бактериостатическое действие в концентрации 3 %, 2 % и 1 %.

Результаты исследования антимикробной активности композиционных смесей дисперсий наночастиц металлов показали, что бактерицидный эффект смеси водных дисперсий наночастиц серебра и меди в отношении стандартного и клинических штаммов *S. aureus* наблюдался в диапазоне концентраций от 3 % до 0,5 %. Аналогичное действие отмечено и для смеси водных диализованных дисперсий наночастиц этих же металлов, однако диапазон бактерицидных концентраций составил от 3 % до 1 %.

В отношении стандартного и клинических штаммов *E. coli* бактерицидный характер проявлялся при действии концентраций от 3 % до 1 % как для смеси водных, так и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди. Более низкие концентрации композиционных смесей дисперсий наночастиц металлов обладали бактериостатическим характером действия в отношении исследуемых штаммов бактерий.

Поскольку эффективность препаратов на основе наноконпонентов зависит от их величины, представляло интерес изучить в динамике изменения этих показателей наночастиц в процессе хранения. С использованием методов электронной микроскопии было установлено, что после хранения в течение 12 месяцев компоненты как водных, так и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов в основном сохраняли наноразмерные характеристики. Для дисперсий меди размер наночастиц напрямую зависел от концентрации стабилизатора ПАВ АОТ: высокие концентрации стабилизатора способствовали сохранению меньших размеров наночастиц меди ($28,9 \pm 7,8$ нм). В случае с дисперсиями наночастиц серебра большую стабильность в процессе хранения проявили наночастицы в составе водных диализованных дисперсий

(58,9±19,6 нм). Однако во всех исследованных дисперсиях наблюдались медленно текущие процессы агрегации наночастиц металлов.

Одним из важнейших этапов взаимодействия бактерий с клетками макроорганизма является процесс адгезии, который обеспечивается рядом поверхностных структур микробных клеток (фимбрии, белки наружной мембраны у грамотрицательных бактерий, белки клеточной стенки в комплексе с тейхоевыми кислотами грамположительных бактерий). Поэтому было изучено влияние водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди на адгезивные свойства стандартных и клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli*. Полученные результаты позволили установить эффективное снижение адгезивной активности всех исследованных штаммов бактерий под действием субингибирующих концентраций опытных образцов наночастиц металлов.

Наноматериалы характеризуются рядом необычных физико-химических и биологических свойств, изменяются их токсикологические характеристики [33, 114]. Поэтому один из важнейших этапов работы был связан с оценкой показателей острой токсичности исследуемых образцов наночастиц металлов на биотест-объектах (*Daphnia magna* Straus). Согласно показателям выживаемости дафний было установлено, что только водная диализованная дисперсия наночастиц серебра характеризовалась как низкотоксичная. Водная дисперсия наночастиц меди и стабилизатор ПАВ АОТ являлись высокотоксичными соединениями, водная дисперсия наночастиц серебра и водная диализованная дисперсия меди – малотоксичными. Установлена зависимость проявления острой токсичности дисперсий наночастиц металлов, которая напрямую зависела от концентрации стабилизатора.

Для борьбы с возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний помимо использования химиотерапевтических средств в последние годы широкое применение находит антимикробная фотодинамическая терапия. Поэтому представляло интерес изучить антимикробную фотодинамическую активность субингибирующих концентраций водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди и оценить перспективы их использования в качестве

эффективных фотосенсибилизаторов. Полученные результаты показали, фотосенсибилизирующие свойства при действии синего светодиодного излучения наблюдались для всех исследованных дисперсий наночастиц металлов. Однако наибольшей антимикробной фотодинамической активностью характеризовалась водная диализованная дисперсия наночастиц серебра, к которому максимальная чувствительность была отмечена у метициллинрезистентного клинического штамма *S. aureus* № 273.

Создание высокоэффективных препаратов для лечения гнойных воспалений кожи и мягких тканей возможно при использовании металлических наночастиц. Поэтому было изучено влияние водных дисперсий наночастиц металлов на процесс регенерации экспериментальной гнойной раны. Была установлена эффективность санации раневых дефектов водной дисперсией наночастиц серебра, которая приводила к быстрому очищению ран и сокращению сроков их заживления в 1,8 раза по сравнению с контрольными показателями. Остальные дисперсии металлических наночастиц также способствовали быстрому очищению ран от гнойного содержимого, однако процессы регенерации были более длительными.

Таким образом, высокая антимикробная активность водных и водных диализованных дисперсий наночастиц серебра и меди открывает перспективы их использования для создания дезинфицирующих и антисептических средств широкого спектра действия для борьбы с полирезистентными штаммами микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди, полученные биохимическим синтезом, проявляют высокую антимикробную активность в отношении клинических штаммов *S. aureus* и *E. coli*, наиболее выраженную в отношении штаммов *S. aureus*. Антимикробная активность водных дисперсий наночастиц металлов носит дозозависимый характер.

2. Водные и водные диализованные дисперсии наночастиц серебра и меди, полученные биохимическим синтезом, эффективно снижают адгезивную активность стандартных и клинических штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий до неадгезивного уровня вне зависимости от вида металлических наночастиц.

3. Показатели острой токсичности водных и водных диализованных дисперсий наночастиц металлов, полученные биохимическим синтезом, зависят от концентрации стабилизатора ПАВ АОТ. Водная диализованная дисперсия наночастиц серебра в диапазоне 1 %-0,125 % не оказывает токсического действия на биотест-объект *Daphnia magna* Straus .

4. Комплексное воздействие синего светодиодного излучения (405 нм) и водных дисперсий наночастиц серебра и меди способствует ингибированию роста стандартного и клинического штаммов *S. aureus*, что позволяет рассматривать данные наноструктуры в качестве перспективных фотосенсибилизаторов.

5. Водная диализованная дисперсия наночастиц серебра полученные биохимическим синтезом, оказывает эффективное saniрующее действие на экспериментальные гнойные раны, что способствует сокращению сроков их заживления в 1,8 раза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОТ	диоктилсульфосукцинат натрия
ИАМ	индекс адгезии микроорганизма
КА	коэффициент адгезии
КОЕ	колониобразующие единицы
МПА	мясо-пептонный агар
МПБ	мясо-пептонный бульон
МПК	минимальная подавляющая концентрация
ПАВ	поверхностно-активное вещество
СПА	средний показатель адгезии
AgW	водный раствор наночастиц серебра
AgWD	водный диализованный раствор серебра
CuW	Водный раствор наночастиц меди
CuWD	Водный диализованный раствор меди
MSSA	метициллинчувствительный <i>S. aureus</i>
MRSA	метициллинрезистентный <i>S. aureus</i>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Абаева, Л. Ф. Наночастицы и нанотехнологии сегодня и завтра / Л. Ф. Абаева, В. И. Шумский, Е. Н. Петрицкая, Д. А. Рогаткин, П. Н. Любченко // Альманах клинической медицины. – 2010. – № 22. – С. 10-17.
- 2 Абаев, А. К. Эффективность антисептиков и значение микрофлоры в процессе раневого заживления / А. К. Абаев, Н. Р. Прокопчук, А. А. Адарченко // Детская хирургия. – 2008. – № 1. – С. 25-29.
- 3 Азнабаева, Л. М. Модификация антибиотикорезистентности в условиях микробного симбиоза / Л. М. Азнабаева, Б. Я. Усвяцов, О. В. Бухарин // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55. – № 5-6. – С. 14-17.
- 4 Аккизова, Ф. Ю. Основные принципы антимикробной химиотерапии / Ф. Ю. Аккизова, Л. В. Чернышова, З. Ф. Хаараева // Методические разработки. – Нальчик, 2004. – 19 с.
- 5 Александрова, Г. П. Наноструктурные металлосодержащие биосовместимые материалы – новые потенциальные антимикробные средства / Г. П. Александрова, Б. Г. Сухов, Л. А. Грищенко, Т. В. Фадеева, Л. Б. Корякина, В. И. Дубровина, Т. А. Иванова, С. А. Витязева, С. А. Медведева, А. С. Коган, Б. А. Трофимов // Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сб. материалов науч.-практ. конф. с междунар. участ., Новосибирск, – 2007. – Ч. 1. – С. 172–176.
- 6 Алешина, Е. С. Оценка биологической активности углеродных наноматериалов в тесте бактерицидности / Е. С. Алешина, Д. Г. Дерябин, Л. В. Ефремова // Вестник ОГУ. – 2011. – № 12 (131). – С. 315-317.
- 7 Андреева, И. В. Самостоятельное применение антимикробных препаратов населения: результаты многоцентрового исследования / И. В. Андреева, Л. С. Страчунский, С. А. Рачина, Н. А. Петроченкова // Клиническая фармакология и терапия. 2002. – Т. 11. - № 2. – С. 25-29.

- 8 Андрусишина, И. Н. Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности / И. Н. Андрусишина // Сучасні проблеми токсикології. – 2011. – № 3. – С. 5-14.
- 9 Анфимова, Н. А. Фотодинамическая терапия: патогенетическое обоснование эффективности при вульгарных угрях / Н. Потеев, С.Б. Ткаченко, Е. А. Шугинина, Н. А. Анфимова // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2005. – № 5. – С. 35-40.
- 10 Афанасьева, Д. С. Исследование бактерицидной активности золь различных металлов / Д. С. Афанасьева, Т. С. Дульцева // Материалы Всерос. 70-й итоговой науч. студен. конф. им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2011. – С. 245-247.
- 11 Ашмарин, И. П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин., А.А. Воробьев. – Л.: Изд-во мед. лит. – 1986. – 184 с.
- 12 Бабушкина, И. В. Изучение действия наночастиц железа и сплава наночастиц железа, цинка и меди на грамотрицательные бактерии / И. В. Бабушкина, В. Б. Бородулин, Г. В. Коршунов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 9. – С. 85.
- 13 Бабушкина, И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / И. В. Бабушкина, В. Б. Бородулин, Г. В. Коршунов, Д. М. Пучиньян // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – № 1. – С. 11-14.
- 14 Бабушкина, И. В. Регенерация экспериментальной раны под влиянием наночастиц цинка / И. В. Бабушкина, Е. В. Гладкова, И. А. Мамонова // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. XIX. – № 4. – С. 16-18.
- 15 Банин, И. Н. Анализ эффективности местного лечения гнойно-воспалительной патологии при использовании импульсного потока лечебного раствора / И. Н. Банин, О. Е. Минаков, И. П. Мошуров, М. А. Черных // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2008. – Т. 7. – № 1. – С. 106-110.
- 16 Безводицкая, А. А. Обоснование и экспериментальное применение мази «Процелан» при лечении гнойных ран / А. А. Безводицкая, Г. Г. Кондратенко,

- Т. А. Летковская, Л. В. Половинкин // Медицинский журнал. – 2007. – № 2. – С. 15-17.
- 17 Белов, А. М. Изучение действия ферромагнитной жидкости, содержащей сплав наночастиц Cu, Zn, Fe, на уропатогенные штаммы *E. coli* и *Ps. aeruginosa* / А. М. Белов, В. Б. Бородулин, П. В. Глыбочко, С. П. Власова, А. В. Федорова, Э. К. Добринский // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2006. - № 4. – С. 94-97.
- 18 Березин, А. Г. Характеристика и клиническое значение бета-лактамаз расширенного спектра / А. Г. Березин, О. М. Ромашов, С. В. Яковлев, С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т.48. – № 7. – С. 5-11.
- 19 Березняков, И. Г. Резистентность к антибиотикам: причины, механизмы, пути преодоления / И. Г. Березняков // Клин. антибиотикотерапия. – 2001. – № 4. – С. 18-22.
- 20 Блатун, Л. А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения / Л. А. Блатун // Consilium-medicum. – 2007. – № 1. – Т. 9. – С. 3.
- 21 Благонравова, А. С. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений / А. С. Благонравова, А. Н. Афонин, О. Н. Воробьева, И. Ю. Широкова // Медицинский альманах. – 2011. – № 5 (18). – С. 215-218.
- 22 Богословская, О. А. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных. Оценка безопасности введения наночастиц металлов в организм / О. А. Богословская, Е. А. Сизова, В. С. Полякова, С. А. Мирошников, И. О. Лейпунский, И. П. Ольховская, Н. Н. Глущенко // Вестник ОГУ. – 2009. - № 2. – С. 124-127.
- 23 Богословская, О. А. Биологические свойства и методы стандартизации наночастиц меди / О. А. Богословская, Н. Н. Глущенко, И. О. Лейпунский,

- И. П. Ольховская, М. Н. Овсянникова // Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины: сборник материалов науч.-практ. конф. с междунар. участ. – Новосибирск, 2007. – Ч. 1. – С. 177-181.
- 24 Богун, Л. В. Резистентность микроорганизмов, обусловленная бета-лактамазами, и способы её преодоления / Л. В. Богун // Газета «Новости медицины и фармации». – 2007. – № 19 (277).
- 25 Бондаренко, В. М. Эффект фотодинамического воздействия металлокомплексов производных хлорина Е6 на условно-патогенные бактерии с использованием сверхъярких светодиодов «холодного» белого света / В. М. Бондаренко, Е. В. Николаева, А. Н. Кузиков, Г. Н. Коновалова, Е. В. Лихачева // Лазерная медицина. – 2008. – № 12. – С. 26-30.
- 26 Брофман, А. В. Влияние гелий-неонового и ультрафиолетового лазерного излучения на стафилококковую микробную флору при гнойных гайморитах / А. В. Брофман, А. М. Сандул, В. А. Нахаба [и др.] // Здоровоохранение. – 1989. – № 4. – С. 14-16.
- 27 Бычковский, П. М. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / П. М. Бычковский, А. А. Кладиев, С. О. Соломевич, С. Ю. Щеголев // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. – № 3. – С. 37-46.
- 28 Венгерович, Н. Г. Покрытие для ран, содержащее коллоидные растворы нанокластеров Ag, Zn, Cu⁰ / Н. Г. Венгерович, В. А. Попов, А. К. Хрипунов // Инновационная деятельность в ВС РФ: труды всеармейской научно-практической конф. – СПб.: ВАС, 2010. – С. 155-156.
- 29 Волосовец, А. П. Современные взгляды на проблему антибиотикорезистентности и её преодоление в клинической педиатрии / А. П. Волосовец, С. П. Кривоустов, Е. И. Юлиш // Здоровье ребенка. – 2007. – № 6 (9). – С. 62-70.
- 30 Воробьев, А. А., Мир микробов / А. А. Воробьев, А. Л. Гинцбург, В. М. Бондаренко // Вестник РАМН. – 2000. – № 11. – С. 11-14.

- 31 Воробьева, В. М. Влияние сорбента «Ранесорб» на репаративные процессы гнойных ран / В. М. Воробьева, В. В. Лампатов, А. В. Лепилов, Л. А. Крафт, О. А. Уколова // Фармация. – 2009. – № 6. – С. 46-48.
- 32 Гейниц, А. В. Современный взгляд на механизм фотодинамической терапии. Фотосенсибилизаторы и их биодоступность / А. В. Гейниц, А. Е. Сорокатый, Д. М. Ягудаев и др. // Урология. – 2006. – № 5. – С. 94-98.
- 33 Гендриксон, О. Д. Методы детекции и идентификации техногенных наночастиц / О. Д. Гендриксон, И. В. Сафенкова, А. В. Жердев [и др.] // Биофизика. – 2011. – № 6. – С. 965-994.
- 34 Гинюк, В. А. Применение фототерапии в комплексном лечении экспериментальных гнойных ран / В. А. Гинюк, Г. П. Рычагов, Т. А. Летковская, В. В. Слизень, В. М. Русинович // Экспериментальная хирургия. – 2011. – №1. – Т. 19. – С. 8-15.
- 35 Гиссенс, И. К. Оценка качества антимикробной химиотерапии / И. К. Гиссенс // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 2. – С. 133-147.
- 36 Глущенко, Н.Н. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов / Н. Н. Глущенко, О. А. Богословская, И. П. Ольховская // Химическая физика. – 2002. – Т. 21. № 4. – С. 79-85.
- 37 Глущенко, Н.Н. Пат. № 2446810 РФ «Антимикробные агенты» / Н. Н.Глущенко, О. А.Богословская, А. А. Рахметова, Т. П. Алексеева и др.; № 2010127540/15, заявл. 06.07.10; опубл. 10.04.12. – Бюл. № 10.
- 38 Гуггенбихлер, Й. П. Пат. № 2473366 РФ «Вещество, обладающее антимикробным действием» / Й. П. Гуггенбихлер, Н. Эберхардт, Х-П. Мартинц, Х. Вильднер; № 2009117726/15, заявл. 20.12.10; опубл. 27.01.13. – Бюл. № 3.
- 39 Гольцева, Е. В. Механизмы возникновения и пути преодоления резистентности у различных лекарственных препаратов / Е. В. Гольцева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 6. – С. 7-9.

- 40 Гофман, В. Р. Применение лазеротерапии при воспалительных заболеваниях околоносовых пазух / В. Р. Гофман, А. С. Киселев, И. В. Ткачук // Российская ринология. – 1997. – № 2. – С. 36-37.
- 41 Григорьева, Г. С. Реальная нанофармакология: становление, мифы и успех липосомофармакологии / Г. С. Григорьева // Фармакология и лекарственная токсикология. – 2007. – Т. 4. – № 5. – С. 83-88.
- 42 Григорьян, А. Ю. Имобилизованные формы антисептиков для лечения гнойных ран в эксперименте / А. Ю. Григорьян, А. И. Бежин, Т. А. Панкрушева, А. В. Иванов, Л. В. Жилиева, Е. В. Кобзарева, В. Н. Мишустин // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. – Вып. № 4. – С. 25-34.
- 43 Григорьян, А. Ю. Местное лечение гнойных ран препаратами на основе энтеросгеля (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17 / Григорьян Арсен Юрьевич. – Курск, 2012. – 113 с.
- 44 Губин, С. П. Что такое наночастица? Тенденции развития нанохимии и нанотехнологии / С. П. Губин // Росс. Хим. Журнал. – 2000. – XLIV. – № 6. – С. 23-31.
- 45 Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства» / С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // Успехи Химии. – 2005. – Т. 74. – № 6. – С. 539-574.
- 46 Дворецкий, Л. И. Ошибки в антибактериальной терапии инфекций дыхательных путей в амбулаторной практике / Л. И. Дворецкий, С. В. Яковлев // Лечащий врач. – 2003. – № 8.
- 47 Дмитриев, В. А. Проблема взаимодействия антибиотиков с нестероидными противовоспалительными средствами (миниобзор) / В. А. Дмитриев, Д. А. Сычев, В. Г. Кулес // Антибиотики и химиотерапия. – 2008. – Т. 53. – № 1-2. – С. 30-32.
- 48 Джумагазиева, Д. С., Исследование мутагенного действия золотых наночастиц в микроядерном тесте / Д. С. Джумагазиева, Г. Н. Маслякова, Л. В. Сулейманова, А. Б. Бучарская, С. С. Фирсова, Б. Н. Хлебцов, Г. С.

- Терентюк, С. М. Кун, Н. Г. Хлебцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 6. – С. 677-680.
- 49 Дуванский, В. А. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении больных с острыми гнойными заболеваниями мягких тканей / В. А. Дуванский // Лазерная медицина. – 2003. – № 7 (3-4). – С. 41-45.
- 50 Дудакова, Ю. С. Изучение биологического действия наночастиц цинка / Ю. С. Дудакова, В. Б. Бородулин // Нанотехника. 2009. №3. С. 72 - 75.
- 51 Дьяченко, А. Г. Устойчивость бактерий к антибиотикам и ее эволюция / А. Г. Дьяченко // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2012. – № 4. – С. 5-11.
- 52 Евстропов, А. Н. Экспериментальная стафилококковая инфекция: микробиологические и иммуноморфологические аспекты / А. Н. Евстропов, Т. А. Агеева, Л. Н. Захарова, А. К. Балтабаева, Ю. А. Пименова // Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – № 4. – С.46-49.
- 53 Егорова, Е. М. 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.
- 54 Егорова, Е. М. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах / Е. М. Егорова, А. А. Ревина, Т. Н. Ростовщикова, О. И. Киселева // Вестник Московского университета. – Серия 2. – Химия. – 2001. – Т. 42. – № 5. – С. 332-334.
- 55 Егорова, Е. М. Наночастицы металлов в растворах: биохимический синтез, свойства и применение: автореф. дис. ... докт. хим. наук: 03.01.06 / Егорова Елена Михайловна. – М., 2011. – 53 с.
- 56 Егорова, Е. М. Биологические эффекты наночастиц металлов / Е. М. Егорова, А. А. Кубатиаев, В. И. Швец. – М.: Наука, 2014. – 350 с.
- 57 Ершов, Б. Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства / Б. Г. Ершов // Российский химический журнал. – 2001. – Т. XLV. – № 3. – С. 20-30.

- 58 Ефремова, Н. В. Изучение влияния фотодинамической терапии (ФДТ) на отдельные виды микроорганизмов при заболеваниях пародонта / Н. В. Ефремова, Н. А. Дмитриева, Е. К. Кречина, Л. Б. Ярыгина, В. В. Маслова, О. М. Ефимович, Н. Н. Домашева // Лазерная медицина. – 2014. – № 1. – С. 23-25.
- 59 Затолокин, В. Д. Водные дисперсии оксидных наноструктур металлов при местном лечении раневых процессов / В. Д. Затолокин, М. А. Халилов, А. С. Мошкин // Учёные записки Орловского Государственного Университета. – 2008. – №4. – С. 50-54.
- 60 Зродников, В.С. Пат. 2316366 РФ. Способ фотодинамической инактивации бактерий / В. С. Зродников, З. В. Запорожцева, В. А. Подсосонный; 2006103639/14; заявл. 20.08.2007; опубл. 10.02.08. – Бюл. № 4
- 61 Ильин, А. А. Физико-химические и каталитические свойства ультрадисперсных (наноразмерных) медьсодержащих порошков, полученных электрохимическим методом / А. А. Ильин, В. И. Парфенюк, М. В. Тесакова // Химия и химическая технология. – 2008. – Т. 51. – № 11. – С. 22-25.
- 62 Карандашов, В. И. Фототерапия и ее место в современной медицине / В. И. Карандашов, Е. Б. Петухов, Н. Р. Палеев, Ю. С. Диасамидзе // Вестник РАМН. – 2004. – № 7. – С. 15-19.
- 63 Кибрик, Б. С. Новые подходы к лечению больных туберкулезом с лекарственной устойчивостью возбудителя с использованием наночастиц серебра / Б. С. Кибрик, А. В. Павлов, А. В. Захаров, О. Ю. Сосина // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 11. – С. 37-41.
- 64 Кістерська, Л. Д. Дослідження фізико-хімічних властивостей та протимікробної активності наносупензій срібла / Л. Д. Кістерська, В. В. Зозуля, В. М. Перевертайло, В. В. Садохін, В. П. Садохін, О. Б. Логінова, В. А. Прокопенко, Н. Г. Багно, В. О. Приходько // Наноструктурное материаловедение. – 2009. – № 2. – С. 33-39.

- 65 Колсанов, А. В. Современная методология лечения ран и раневой инфекции / А. В. Колсанов // Здоровоохранение Ульяновской области в 21 веке: материалы науч.- практ. конф. – Ульяновск, 2002. – С. 20-21.
- 66 Косинец, А. Н. Ретроспективный анализ чувствительности *S.aureus* к традиционно применяемым в хирургической практике антисептикам / А. Н. Косинец, А. В. Фролова, В. К. Окулич // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2010. – Т. 9. – № 4. – С. 161-166.
- 67 Красильников, А. П. Некоторые аспекты применения современных антисептиков / А. П. Красильников, Е. И. Гудкова, Н. Л. Рябцева // Стратегия и тактика применения антисептиков в медицине: материалы междунар. конф. – Винница, 2000. – С. 315-316.
- 68 Кузин, М. И. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей / М. И. Кузин, Б. М. Костюченков – М.: Медицина, 1990. – 592 с.
- 69 Кузьмина, А. В. Вопросы безопасности при использовании антибактериальных препаратов в современной клинической практике / А. В. Кузьмина, В. А. Поливанов, И. Л. Асецкая, С. К. Зырянов // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2015. – № 17 (2). – Р. 146-156.
- 70 Куликова, М. В. Синтез и оптические свойства наночастиц оксида железа для фотодинамической терапии / М. В. Куликова, В. И. Кочубей // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 206-209.
- 71 Козлов, Р. С. Антимикробные препараты и резистентность микроорганизмов: две стороны медали / Р. С. Козлов // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2007. – № 3. – С. 30-32.
- 72 Лебедев, В. С. Структурные изменения поверхности бактерий *Escherichia coli* и медьиндуцированная проницаемость плазматической мембраны / В. С. Лебедев, Л. А. Володина, Е. Ю. Дейнега, Ю. И. Федоров // Биофизика. – 2005. – Т. 50. – № 1. – С. 107-113.

- 73 Луцевич, О. Э. Современный взгляд на патофизиологию и лечение гнойных ран / О. Э. Луцевич, О. Б. Тамразова, А. Ю. Шikuнова, А. С. Плешков, Г. И.-О. Исмаилов, Ю. В. Воротилов, П. М. Толстых // Хирургия. – 2011. - № 5. – С. 72-77.
- 74 Малафеева, Э. В. Антимикробная и токсикологическая характеристика антибактериальной мази с наночастицами серебра / Э. В. Малафеева, А. А. Хохлов, А. Л. Хохлов, Г. Н. Крейцберг, И. В. Голиков, И. Е. Грачева, И. В. Завойстый, П. П. Саватеев // Ремедиум. – 2011. – № 4. – С. 96-97.
- 75 Макаров, В. В. «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений / В. В. Макаров, А. Лав, О. В. Сеницына, С. С. Макарова, И. В. Яминский, М. Э.Тальянский, Н. О. Калинина // Acta Naturae. – 2014. – Т. 6, № 1 (20). – С. 37-47.
- 76 Мамонова, И. А. Действие наночастиц меди на клинические штаммы *Staphylococcus epidermidis* / И. А. Мамонова // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. –Т. XVIII. – № 1. – С. 27-28.
- 77 Масычева, В. И. Наноматериалы. регуляторные вопросы / В. И. Масычева, Е. Д. Даниленко, Т. Ю. Иванькина, Г. М. Сысоева, М. И. Кисурина, А. О. Белкина // Ремедиум. – 2008. – № 9. – С. 12-16.
- 78 Медведева, Н. В. Нанобиотехнология и наномедицина / Н. В. Медведева, О. М. Ипатова, Ю. Д. Иванов, А. И. Дрожжин, А. И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2006. – № 6. – С. 529-546.
- 79 Методические рекомендации МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2004. Т. 6. № 4. С. 306-359.
- 80 Мошкин, А. С. Новые методы анализа течения и лечения гнойных ран в эксперименте / А. С. Мошкин / Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. Известия ОрелГТУ. – 2009. – № 5 – С. 100-106.

- 81 Науменко, З. С. Антибиотикорезистентность микрофлоры ран открытых переломов (II сообщение) / З. С. Науменко, И. И. Мартель, В. В. Гостев // Травматология и ортопедия России. – 2010. – № 1. – С. 33-37.
- 82 Нургазина, Г. М. Синтез металлосодержащих нанокompозитов и их применение в катализе: дис. ... докт. философии: 6D0606000 / Нургазина Гульнар Мурзакановна. – Астана, 2013. - 116 с.
- 83 Огиренко, А. П. Антимикробная фотодинамическая терапия / А. П. Огиренко, Н. Е. Васильев // Лазерная медицина. – 2002. – № 6. – С. 32-38.
- 84 Падейская, Е. Н. Некоторые аспекты истории антимикробной терапии / Е. Н. Падейская // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т. 12. – № 4. – С. 353-360.
- 85 Пальцев, М. А. Нанотехнологии в медицине и фармации / М. А. Пальцев // Ремедиум. – 2008. – № 9. – С. 6-12.
- 86 Патон, Б. Э. Нанонаука и нанотехнологии: технический, медицинский и социальный аспекты / Б. Э. Патон, В. Ф. Москаленко, И. С. Чекман, Б. О. Мовчан // Вестник НАН Украины. – 2009. – № 6. – С. 18-26.
- 87 Подсвинова, И. А. Микробиологический мониторинг госпитальных штаммов энтеробактерий – продуцентов β -лактамаз расширенного спектра в отделении реанимации и интенсивной терапии Ставропольского краевого клинического центра специализированных видов медицинской помощи / И. А. Подсвинова, А. Ю. Миронов, Е. В. Алиева // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2012. - № 2. – С. 105-109.
- 88 Попов, В. А. Активность мембранных ферментов в пищеварительных и непищеварительных органах при внутрибрюшинном введении комплекса С60 с поливинилпирролидоном / В. А. Попов, М. А. Тюнии, Л.Б. Пиотровский // Биосовместимые нано-структурные материалы и покрытия медицинского назначения: сборник научных трудов Российской школы-конференции молодых ученых и преподавателей. – Белгород, 2006. – С. 381-385.

- 89 Попова, А. Е. Применение фотодинамической терапии в комплексном лечении хронического пародонтита / А. Е. Попова, Н. И. Крихели // Российская стоматология. – 2012. – № 2. – С. 31-37.
- 90 Пошвина, Д. В. Антибиотикорезистентность клинических изолятов бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных / Д. В. Пошвина, М. В. Сычева // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2014. – № 3. – С. 1-10.
- 91 Протасов, К. В. Статистический анализ экспериментальных данных. М.: МИР, 2005. – 142 с.
- 92 Пхакадзе, Т. Я. Выбор антибактериальных средств для профилактики и лечения инфекционных осложнений у травматолого-ортопедических больных на основе микробиологического мониторинга / Т. Я. Пхакадзе, Г. Г. Окропиридзе, Э. С. Малышева // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова. – 2009. – № 4. – С. 73-78.
- 93 Радиллов, А. С. Особенности проявления токсичности наночастиц / А. С. Радиллов, С. А. Дулов, А. В. Глушкова // Гигиена и санитария. – 2011. – № 2. – С. 81-86.
- 94 Рахметова, А. А. Изучение биологической активности наночастиц меди, различающихся по дисперсности и фазовому составу: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.04.02/ Рахметова Алла Александровна. – М., 2011. – 24 с.
- 95 Рогаткин, Д. А. Наносеребро и микроорганизмы / Д. А. Рогаткин, О. Д. Смирнова // Химия и жизнь. – 2012. – № 10. – С. 38-41.
- 96 Руденко, А. В. Сорбционное действие энтеросгеля в отношении различных видов микроорганизмов / А. В. Руденко, И. В. Багдасарова, А. П. Брудько // Провизор. – 2005. – № 10. – С. 42-43.
- 97 Рустамова, Е. Г. Введение наночастиц (2-10 нм) в матрицу полиэтилена как путь создания стандартных образцов: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.01/ Рустамова Екатерина Геннадьевна. – М., 2012. – 24 с.

- 98 Семёнов, В. М. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В. М. Семёнов, Т. И. Дмитраченко, И. В. Жильцов // Медицинские новости. – 2004. – № 2. – С. 10-17.
- 99 Серегина, Н. В. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н. В. Серегина, Т. В. Честнова, В. А. Жеребцова, В. А. Хромушкин // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. XV. – № 3. – С. 175-177.
- 100 Сидоренко, С. В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины / С. В. Сидоренко // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 38-41.
- 101 Сидоренко, С. В. Социально-экономические аспекты приобретенной бактериальной резистентности / С. В. Сидоренко, А. С. Колбин, Ю. Е. Балыкина // Клиническая фармакология и терапия. – 2010. – № 5. – С. 16-22.
- 102 Синопальников, А. И. Комплаентность антибактериальной терапии инфекций дыхательных путей / А. И. Синопальников, А. А. Зайцев // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10. – № 1. – С. 15-23.
- 103 Сипкин, А. В. Использование магнитных наночастиц в лечении раневых процессов на лабораторных животных / А. В. Сипкин, В. Ю. Афонькин, К. Г. Добрецов, С. В. Столяр, О. А. Коленчукова, А. С. Лопатин // Вестник оториноларингологии. – 2009. – № 5. – С. 19-21.
- 104 Скворцевич, Е. Г., Биологические эффекты наноструктур углерода / Е. Г. Скворцевич, Р. В. Романов, О. В. Стурлис // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2009. – Сер. 3. – Вып. 1. – С. 114-119.
- 105 Смирнова, Г. В. Роль глутатиона при ответе *Escherichia coli* на осмотический шок / Г. В. Смирнова, Т. А. Красных, О. Н. Октябрьский // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – № 9. – С. 1195-1201.

- 106 Степанов, В. А. Наноразмерные формы лекарственных соединений (обзор) / В. А. Степанов, Е. В. Назарова, Г. В. Назаров, Н. Н. Каркищенко, С. Е. Галан, М. М. Мурадов // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – № 3. – С. 41-48.
- 107 Сосенкова, Л. С. Наночастицы серебра малого размера для исследований биологических эффектов / Л. С. Сосенкова, Е. М. Егорова // Журнал физической химии. – 2011. – Т. 85. – № 2. – С. 317-326.
- 108 Соцкая, Н. В. Физико-химические свойства поверхностей, модифицированных наночастицами металлов / Н. В. Соцкая, О. В. Долгих, В. М. Кашкаров, А. С. Леньшин, Е. А. Котлярова, С. В. Макаров // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9. – Вып. 5. – С. 643-652.
- 109 Страчунский, Л. С. Бета-лактамазы расширенного спектра быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л. С. Страчунский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – № 1. – С. 92-96.
- 110 Супотницкий, М. В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М. В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4-44.
- 111 Странадко, Е. Ф. Гастродуоденальный геликобактериоз и ассоциированные с ним заболевания как объекты для фотодинамической терапии / Е. Ф. Странадко // Лазерная медицина. – 2002. – № 6. – С. 53-58.
- 112 Странадко, Е. Ф. Основные этапы развития и современное состояние фотодинамической терапии в России / Е. Ф. Странадко // Лазерная медицина. – 2012. – Т. 16. – Вып. 2. – С. 4-15.
- 113 Сэндл, Т. Механизмы бактериальной адгезии / Т. Сэндл // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – № 1 (49). – С. 54-58.
- 114 Терещенко В.П. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы / В.П. Терещенко, Т.Н. Картель. – Монография – Киев: Наукова думка. – 2010. – 240 с.
- 115 Титов, Л. П. Микробы облачаются в «броню». Что делать? / Л. П. Титов // Газета «Медицинский вестник». – 2011. – 21 июля – № 29 (1020).

- 116 Титов, А. В. Изучение взаимодействия наночастиц серебра с молекулой ДНК в водно-солевом растворе / А. В. Титов, М. С. Варшавский, К. Г. Лопатько, Н. А. Касьяненко // Вестник Санкт-Петербургского университета. – Сер. 4. – 2011. – Вып. 4. - С. 229-233.
- 117 Тихонова, Л. В. Пат. 2295347 РФ. Способ лечения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей / Л. В. Тихонова, С. В. Шаматкова, Д. П. Бондарев; № 2005134503/14; заявл. 07.11.2005; опубл. 20.03.07. – Бюл. № 8.
- 118 Толстых, П. И. Фотодинамическое воздействие на бактериальную микрофлору ран в эксперименте / П. И. Толстых, Е. Ф. Странадко, У. М. Корабоев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 2. – С. 85-87.
- 119 Туркутюков, В. Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам / В. Б. Туркутюков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 28-31.
- 120 Туровский, А. Б. Особенности фотодинамической терапии нозокомиальных инфекций верхних дыхательных путей» / А. Б. Туровский, В. Г. Жуховицкий, Ю. В. Талалайко // Российская оториноларингология. – Приложение № 1. – 2010. – С. 59-61.
- 121 Усвяцов, Б. Я. Взаимодействие бактерий и эритроцитов / Б. Я. Усвяцов, Е. А. Ханина, О. В. Бухарин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 4. – С. 89-95
- 122 Утенков, Д. Г. Сравнительная характеристика современных методов лечения ран в эксперименте: (эксперим. исслед.): автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.27 / Д.Г. Утенков; Волгоград, гос. мед. ун-т. Волгоград, 2005. - 22 с.
- 123 Фаткуллина, Л. Д. Анализ взаимодействия наночастиц железа с клеточными мембранами в модельных экспериментах / Л. Д. Фаткуллина, А. А. Кривандин, Е. Б. Бурлакова // Математика. Компьютер. Образование: сб. тр. XVI Междунар. конф. – 2009. – Т. 2.
- 124 Хмель, И. А. Антибактериальные эффекты ионов серебра: влияние на рост грамотрицательных бактерий и образование биопленок / И. А. Хмель,

- О. А. Кокшарова, М. А. Радциг // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2009. – № 4. – С. 27-31.
- 125 Ходакова, Н. Г. Оценка резистентности к метициллину клинических штаммов стафилококков / Н. Г. Ходакова, Г. М. Шуб, И. Г. Швиденко // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – Т. 4. – № 2. – С. 56-60.
- 126 Чегодарь, Д. В. Эффекты наночастиц серебра при экспериментальном перитоните / Д. В. Чегодарь, А. В. Кубышкин, В. В. Панасенко // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 67-74.
- 127 Черкасова, О. Г. Использование мелкодисперсных железосодержащих композитов в лечении и диагностике: достижения и проблемы / О. Г. Черкасова, Е. Ю. Шабалкина, Ю. А. Харитонов, С. Н. Цыбуев, В. И. Коченов // СТМ. – 2012. – № 3. – С. 113-120.
- 128 Цибулевский, А. Ю. Микроэкология человека (Часть II) / А. Ю. Цибулевский, А. В. Соколов // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 7. – С. 22-26.
- 129 Шин, Ф. Е. Фотодинамическая терапия экспериментальных ожоговых ран / Ф. Е. Шин, П. И. Толстых, Е. Ф. Странадко [и др.] // Лазерная медицина. – 2009. – № 13. – С. 55-59.
- 130 Шмойлова, Р.А. Практикум по теории статистики / Р. А. Шмойлова, В. Г. Минашкин, Н. А. Садовникова. – М.: Финансы и статистика, 2011. – 416 с.
- 131 Эйдельштейн, М. В. β -лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования / М. В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. 2001. Т. 3. № 3. С. 223-242.
- 132 Яковлев, В. П. Рациональная антимикробная фармакотерапия / В. П. Яковлев, С. В. Яковлев. – М.: Бионика, 2002. – 650 с.
- 133 Яковлев, В. П. Цефоперазон, цефоперазон/сульбактам. Антибиотики группы цефлоспоринов / В. П. Яковлев, С. В. Яковлев. – М.: Дипак, 2008. – 184 с.

- 134 Ayala-Núñez, N. V. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter / N. V. Ayala-Núñez, H. H. Lara, L. Ixtepan, C. Rodríguez // *Nanobiotechnology*. – 2009. – № 5. – P. 2-9.
- 135 Arabi, F. Investigation anti-bacterial effect of zinc oxide nanoparticles upon life of *Listeria monocytogenes* / F. Arabi, M. Imandar, M. Negahdary, M. Imandar, M. Torkamani Noughabi, H. Akbari dastjerdi, M. Fazilati, // *Annals of Biological Research*. – 2012. – № 3 (7). – P. 3679-3685.
- 136 Arora, S. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour / S. Arora, J. M. Rajwade, K. M. Paknikar // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2012. – № 258. – P. 151-165.
- 137 Bush, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections / K. Bush // *Bush Critical Care*. – 2010. – № 14. P. 224. <http://ccforum.com/contenant/14/3/224>.
- 138 Bankura, K. P. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium / K. P. Bankura, D. Maity, M. M. R. Mollick, D. Mondal, B. Bhowmick, M. K. Bain, A. Chakraborty, J. Sarkar, K. Acharya, D. Chattopadhyay // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 89, Is. 4. – P. 1159-1165.
- 139 Barbour, A. Ceftobiprole: a novel cephalosporin with activity against gram-positive and gram-negative pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / A. Barbour, S. Schmidt, K. H. Rand, H. Derendorf // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – № 34. 1. – P. 1-7.
- 140 Behera S. S. Characterization and Evaluation of Antibacterial Activities of Chemically Synthesized Iron Oxide Nanoparticles / S. Behera, J. Patra, K. Pramanik, N. Panda, H. Thatoi // *World Journal of Nano Science and Engineering*. – 2012. – Vol. 2. – № 4. – P. 196-200.
- 141 Bhabra, G. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier / G. Bhabra, A. Sood, B. Fisher, L. Cartwright, M. Saunders et al. // *Nature Nanotechnology*. – 2009. – № 4. – P. 876-883.

- 142 Bowler, P. G. Wound Microbiology and associated approaches to wound management / P. G. Bowler, B. I. Duerden, D. G. Armstrong // *Clin. Microbial. Rev.* – 2001. – № 14. – P. 244-69.
- 143 Bragg, P. D. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli* / P. D. Bragg, D. J. Rainnie // *Can. J. Microbiol.* – 1974. – № 228. – P. 883-889.
- 144 Bonten, M. Ventilator-associated pneumonia: do the bacteria come from the stomach? / M. Bonten, C. Gaillard // *Netherlands Journal of Medicine.* – 1995. – № 46. – P. 1-3.
- 145 Chahine, E. B. Ceftobiprole: The First Broad-Spectrum Anti-methicillinresistant *Staphylococcus aureus* Beta-Lactam / E. B. Chahine, A. O. Narnoo // *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* – 2011. – Vol. 3. – Issue 1. – P. 9-16.
- 146 Cui, Yan. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli* / Yan Cui, Yuyun Zhao, Yue Tian, Wei Zhang, Xiaoying Lü, Xingyu Jiang // *Biomaterials.* – 2012. – № 33. – P. 2327-2333.
- 147 Deresinski, S. Principles of antibiotic therapy in severe infections: optimizing the therapeutic approach by use of laboratory and clinical data / S. Deresinski // *Clinical infectious diseases.* – 2007. – № 45. – P.177-183.
- 148 Díaz-Visurraga J. Metal nanostructures as antibacterial agents / J. Díaz-Visurraga, C. Gutiérrez, C. von Plessing, A. García // *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances // FORMATEX Microbiology Series.* – 2011. – № 3. – Vol. 1. – P. 210-218.
- 149 Donnelly, R. F. Design, Synthesis and Photodynamic Antimicrobial Activity of Ruthenium Trischelate Diimine Complexes / R. F. Donnelly, N. C. Fletcher, P. J. McCague, J. Donnelly, P. A. McCarron, M. M. Tunney // *Letters in Drug Design & Discovery.* 2007. – Vol. 4. – № 3. – P. 175-179.
- 150 Dror-Ehre, A. Silver nanoparticles - *E.coli* colloidal interaction in water and their effect on *E.coli* survival / A. Dror-Ehre, H. Mamane, T. Belenkova, G. Markovich, A. Adin // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2009. – № 339 (2). – P. 521-526.

- 151 Egorova, E. M. Biological effects of silver nanoparticles / E. M. Egorova // Silver nanoparticles: Properties, Characterization and Applications. (Ed. by Audrey E. Welles). - Nova Science Publishers. - New York, 2010. - P.221-258.
- 152 Emami-Karvani, Z. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria / Z. Emami-Karvani, P. Chehrazi // African Journal of Microbiology Research. – 2011. – Vol. 5 (12). – P.1368-1373. doi: 10.5897/AJMR10.159.
- 153 Fencke D. B. Liposomal nanomedicines: an emerging field / D. B. Fencke, A. Chorn, P. R. Cullis // Toxicol. Pathol. – 2008. – Vol. 36. – № 1. – P. 21-29.
- 154 Franci, G. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents / G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero // Molecules. – 2015. – № 20 (5). – P. 8856-8874. doi: 10.3390/molecules20058856.
- 155 Hersh, A. L., Shapiro DJ, Pavia AT, Shah SS Antibiotic Prescribing in Ambulatory Pediatrics in the United States / A. L. Hersh, D. J. Shapiro, A. T. Pavia, S. S. Shah // Pediatrics. – 2011. – № 7. <http://www.antibiotic.ru/index.php?article=2169>
- 156 Gajjar, P. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440 / P. Gajjar, B. Pettee, D. W. Brit, W. Huang, W. P. Johnson, A. J. Anderson // Journal of Biological Engineering. – 2009. - № 3. P. 9. doi:10.1186/1754-1611-3-9.
- 157 Grace, A. N. One pot synthesis of polymer protected gold nanoparticles and nanoprisms in glycerol / A. N. Grace, K Pandian // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2006. – Vol. 290. – Is. 1. – P. 138-142.
- 158 Gubin, S. P. Nanomaterials based on metal-containing nanoparticles in polyethylene and other carbon-chain polymers / S. P. Gubin, G. Yu. Yurkov, I. D. Kosobudsky // Int. J. Mater. Prod. Tech. – 2005. – Vol. 23. – № 1-2. – P. 2-25.
- 159 Gurunathan, S. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria / S. Gurunathan, J. W. Han, D. N. Kwon, J. H. Kim // Nanoscale Res Lett. – 2014. – № 9 (1). – P. 373. doi: 10.1186/1556-276X-9-373. eCollection 2014.

- 160 Guzman, M. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria / M. Guzman, J. Dille, S. Godet // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 8, Is. 1. – P. 37-45.
- 161 Gupta, U. A review of in vitro – in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers / U. Gupta, H. B. Agashe, A. Asthana, N. K. Jain // *Nanomedicine*. – 2006. – V. 2. – № 2. – P. 66-73.
- 162 Gong, P. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles / P. Gong, H. Li, X. He, K. Wang, J. Hu, W. Tan, S. Zhang, X. Yang // *Nanotechnology*. – 2007. – Vol. 18. – № 28 doi:10.1088/0957-4484/18/28/285604
- 163 Junqueira, J. C. Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite green on Staphylococcus, enterobacteriaceae, and Candida / J. C. Junqueira, M. A. Ribeiro, R. D. Rossoni, J. O. Barbosa, S. M. Querido, A. O. Jorge // *Photomed Laser Surg*. – 2010. – Suppl 1. – P. 67-72.
- 164 Hofheinz, R. D. Liposomal encapsulated anti-cancer drugs / R. D. Hofheinz, S. U. Gnad-Vogt, U. Beyer, A. Hochhaus // *Anticancer Drugs*. – 2005. – Vol. 16. – № 7. – P. 691-707.
- 165 Kim, J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2007. – V. 3. – P. 95-101.
- 166 Kim, J. Y. Inactivation of Escherichia coli by Nanoparticulate Zerovalent Iron and Ferrous Ion / J. Y. Kim, H. J. Park, C. Lee, K. L. Nelson, D. L. Sedlak, J. Yoon // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76 (22). – P. 7668-7670.
- 167 Levard, C. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate / C. Levard, B. C. Reinsch, F. M. Michel, C. Oumahi, G. V. Lowry, G. E. Brown, Jr. // *Environ. Sci. Technol*. – 2011. – № 45 (12). – P. 5260–5266.
- 168 Livermore, D. M. Fourteen years in resistance. Review / D. M. Livermore // *International journal of antimicrobial agents*. – 2012. № 39: 4. – P. 283-294.

- 169 Liu, J. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids / J. Liu, R. H. Hurt // *Environmental science & technology*. – 2010. – № 44 (6). P. 2169-2175.
- 170 Mann, H. B. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other / H. B. Mann, D. R. Whitney // *Annals of Mathematical Statistics*. – 1947. – № 18. – P. 50-60.
- 171 Masterton, R. The importance and future of antimicrobial surveillance studies / R. Masterton // *Clinical infectious diseases*. – 2008. – № 47. – P. 21-31.
- 172 Mahdy, S. A. Antimicrobial activity of zero-valent iron nanoparticle / S. A. Mahdy, Q. J. Raheed, P. T. Kalaichelvan // *International Journal of Modern Engineering Research*. – 2012. – Vol. 2. – Issue 1. – P. 578-581.
- 173 Moellering, R. C. JR. Discovering new antimicrobial agents. Review / R. C. Moellering JR // *International journal of antimicrobial agents*. – 2011. – № 37. – P. 2-9.
- 174 Narayanan, P. M. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against Human Pathogens / P. M. Narayanan, W. S. Wilson, A. T. Abraham, M. Sevanan // *BioNanoScience*. – 2012. – Vol. 2. – Issue 4. – P. 329-335.
- 175 Nicolais, L. Metal-Polymer Nanocomposites / L. Nicolais, G. Carotenuto // *Wiley Interscience*. – 2005. – P. 300.
- 176 Oostdijk, E. A. N. Effects of Decontamination of the Oropharynx and Intestinal Tract on Antibiotic Resistance in ICUs / E. A. N. Oostdijk, J. Kesecioglu, M. J. Schultz, et al. // *A Randomized Clinical Trial*. – 2014. – Vol. 312. – № 14. – P. 1429-1437.
- 177 Pagona, G. Углерода nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications / G. Pagona, N. Tagmatarchis // *Med. Chem*. – 2006. – Vol. 13. – № 15. – P. 1789-1798.
- 178 Pal, S. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia*

- coli / S. Pal, Y. K. Tak, J. M. Song // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73. – № 6. – P. 1712-1720.
- 179 Paterson, D. L. The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals / D. L. Paterson // *Clin Infect Dis*. – 2006. – 42 Suppl. – P. 90-95.
- 180 Palza, H. Toward tailor-made biocide materials based on poly(propylene) / copper nanoparticles / H. Palza, S. Gutierrez, K. Delgado, O. Salazar, V. Fuenzalida, J. I. Avila, G. Figueroa, R. Quijada // *Macromolecular Rapid Communications*. 2010. – № 31. – P. 563-567.
- 181 Pelgrift, R. Y. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance / R. Y. Pelgrift, A. J. Friedman // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2013. – № 65 (13-14). – P. 1803-1815. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.011. Epub 2013 Jul 24.
- 182 Prema, P. In-vitro antibacterial activity of gold nanoparticles capped with polysaccharide stabilizing agents / P. Prema, S. Thangapandian // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 5. – Issue 1. – P. 310-314.
- 183 Rai, A. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings / A. Rai, A. Prabhune, C. C. Perry // *J Mater Chem*. – 2010. – № 20. – P. 6789-6798.
- 184 Rizzello, L. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines / L. Rizzello, P. P. Pompa // *Chem Soc Rev*. – 2014. – № 43 (5). – P. 1501-1518. doi: 10.1039/c3cs60218d.
- 185 Padmavathy, N. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study / N. Padmavathy, R. Vijayaraghavan // *Sci. Technol. Adv. Mater*. – 2008. – № 9. – P. 1-7.
- 186 Ravishankar Rai V. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials / Ravishankar Rai V, Jamuna Bai A. // *FORMATEX*. – 2011. – P. 197-209.
- 187 Rosa, L. P. In vitro effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (APDT) using a 660 nm laser and malachite green dye in *Staphylococcus aureus* biofilms

- arranged on compact and cancellous bone specimens / L. P. Rosa, F. C. da Silva, S. A. Nader, G. A. Meira, M. S. Viana // *Lasers in Medical Science*. – 2014. – Vol. 29. – Issue 6. – P. 1959-1965.
- 188 Ruparelia, J. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles / J. Ruparelia, A. Chatterjee, S. Duttagupta, S. Mukherji // *Acta Biomater*. – 2008. – № 4 (3). – P. 707-716.
- 189 Sanvicens, N. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine / N. Sanvicens, M. P. Marco // *Trends Biotechnol*. – 2008. – № 26. – P. 425-433.
- 190 Saxena, A. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity / A. Saxena, R. M. Tripathi, F. Zafar, P. Singh // *Materials Letters*. – 2012. – Vol. 67, Is. 1. – P. 91-94.
- 191 Seil, J. T. Antimicrobial application of nanotechnology: methods and literature / J. T. Seil, T. J. Webster // *International Journal of Nanomedicine*. – 2012. – № 7. – P. 2767-2781.
- 192 Siegel, S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences* / S. Siegel // London' mcgraw-Hill Publishing Co. Ltd., 1956. – 313 p.
- 193 Surti, A. Study of the antibacterial activity of ZnO nanoparticles / A. Surti, S. Radha, S.S. Garje // *Solid state physics: proceedings of the 57th DAE solid state physics symposium*. – Bombay, 2012. – P. 450-451.
- 194 Silva, N. In vitro activity of ceftobiprole against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from humans and animals / N. Silva, H. Radhouani, A. Gonçalves, C. Araújo, J. Rodrigues, G. Igrejas, P. Poeta // *J Antimicrob Chemother*. – 2010. – № 65 (4). – P. 801-803.
- 195 Singh, R. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria / R. Singh, M. S. Smitha, S. P. Singh // *J Nanosci Nanotechnol*. – 2014. – № 14 (7). – P. 4745-56.
- 196 Shin, H. S. Chemical and size effects of nanocomposites of silver and polyvinyl pyrrolidone determined by X-ray photoemission spectroscopy / H. S. Shin,

- H. C. Choi, Y. Jung, S. B. Kim, H. J. Song, H. J. Shin // *Chem. Phys. Lett.* – 2004. – Vol. 383. – P. 418-422.
- 197 Soni, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study of *E. coli* as a model for gram-negative bacteria / I. Soni, B. Salopek-Sondi // *J. Colloid Interface Sci.* – 2004. – № 275. – P. 177-182.
- 198 Spellberg, B. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future / B. Spellberg, J. H. Powers, E. P. Brass // *Clin Infect Dis.* – 2004. – № 38. – P. 1279-1286.
- 199 Szczepanowicz, K. Preparation of silver nanoparticles via chemical reduction and their antimicrobial activity / K. Szczepanowicz, J. Stefańska, R.P. Socha, P. Warszyński // *Physicochem. Probl. Miner. Process.* – 2010. – № 45. – P. 85-98.
- 200 Taurozzi, J. S. Effect of filler incorporation route on the properties of polysulfone–silver nanocomposite membranes of different porosities / J. S. Taurozzia, H. Arulb, V. Z. Bosakc, A. F. Burbanc, T. C. Voicea, M. L. Brueningd, V. V. Tarabaraa // *Journal of Membrane Science.* – 2008. – Vol. 325. – Issue 1. – P. 58-68.
- 201 Tillotson, G. S. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and wound infections in the United States 2005–07: Laboratory-based surveillance study / G. S. Tillotson, D. C. Draghi, D. F. Sahm et al. // *J Antimicrob Chemother.* – 2008. – № 62. – P. 109-115.
- 202 Theuretzbacher, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? / U. Theuretzbacher // *Int J Antimicrob Agents.* – 2009. – № 34 (1). – P. 15-20. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.02.005.
- 203 Tran N. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* / N. Tran, A. Mir, D. Mallik, A. Sinha, S. Nayar, T. J. Webster // *International Journal of Nanomedicine.* – 2010. – № 5. – P. 277-283.
- 204 Theivasanthi, T. Studies of Copper Nanoparticles Effects on Micro-organisms / T. Theivasanthi, M. Alagar // *Scholars Research Library Annals of Biological Research.* – 2011. – Vol. 2 (3). – P. 368-373.

- 205 Tuchina, E. S. Biochemical activity changing of opportunistic microorganisms under the influence of low-coherent blue light / E. S. Tuchina, D. V. Rudik, E. I. Tikhomirova // Proceedings of The International Society for Optical Engineering. –2006. – Vol. 6163. – P. 278-281.
- 206 You, Jia Bacteria and bacteriophage inactivation by silver zinc oxide nanoparticles / You Jia, Zhang Yanyan, Hu Zhiqiang // Colloids and surfaces. Biointerfaces. – 2011. – № 85 (2). – P. 161-167.
- 207 Yang, S. C. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain / S. C. Yang, L. F. Lu, Y. Cai, J. B. Zhu, B. W. Liang, C. Z. Yang B // J. Control. Release. – 1999. – V. 59. – P. 299-307.
- 208 Yamanaka, M. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on Escherichia coli, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis / M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71. – № 11. – P. 7589-7593.
- 209 Yamamoto, O. Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristics / O. Yamamoto, M. Komatsu, J. Sawai, Z. E. Nakagawa // J. Mater Sci. Mater. Med. – 2004. – № 15. – P. 847-851.
- 210 Xie, Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against Campylobacter jejuni / Y. Xie, Y. He, P. L. Irwin, T. Jin, X. Shi // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77. – № 7. – P. 2325-2331.
- 211 Vertelov, G. K. A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles / G. K. Vertelov, Y. A. Krutyakov, O. V. Efremenkova, A. Y. Olenin, G. V. Lisichkin // Nanotechnology. – 2008. – № 19 (35). P. 355-707. doi: 10.1088/0957-4484/19/35/355707. Epub 2008 Jul 18.
- 212 Wilcox, M. H. The tide of antimicrobial resistance and selection / M. H. Wilcox // Int J Antimicrob Agents. – 2009. – 34. Suppl 3. – P. 6-10.

- 213 Westergren, H. Propionebacteri Hoban um acnes in cultures from ventriculo-peritoneal shunts: infection or contamination? / H. Westergren, V. Westergren, U. Forsum // Acta Neurochirurgica. – 1997. – Vol. 139. – P. 33-36.
- 214 Weerasuriya, K. Containing antimicrobial resistance: a renewed effort / K. Weerasuriya, J. Stelling, T. F. O'Brien // Bull World Health Organ. – 2010. – № 88 (12). – P. 878.
- 215 Zawrah, M. F. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens / M. F. Zawrah, Sherein I. Abd El-Moez // Life Science Journal. – 2011. – № 8 (4). – P. 37-44.