

ЛАЗЕРНО-АБЛЯЦИОННОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ НАНОСМАЗОК НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ АНТИСЕПТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА

И. Н. Сараева¹, Э. Р. Толордава¹, Д. С. Позднякова², С. И. Кудряшов¹

В работе продемонстрирована возможность снижения популяции бактерий с использованием вязких коллоидных растворов на основе наночастиц селена, серебра и меди, полученных методом одностадийной лазерной абляции в глицерине и силиконовом масле.

Ключевые слова: лазерная абляция, антибактериальные наночастицы, вязкие среды.

Введение. При возникновении ран, спровоцированных оперативными вмешательствами, несчастными случаями и заболеваниями, практически сразу начинается их активная колонизация патогенными микроорганизмами. При отсутствии надлежащего ухода за ранами колонизация бактерий происходит более интенсивно, что может привести к серьезным хроническим инфекциям. Борьба с бактериальной обсемененностью дополнительно осложнена возникновением резистентности микроорганизмов к антибиотикам [1]. В связи с этим необходима разработка средств борьбы с раневыми инфекциями, имеющих высокую эффективность уничтожения бактериальных штаммов с приобретенной резистентностью. К таким методам можно отнести использование наночастиц (НЧ) серебра, меди и селена, эффективность которых показана рядом публикаций [2–4]. Для лечения раневых инфекций также важна среда, в которой находятся НЧ. Частицы в вязких средах проще нанести и удерживать на ранах, а также использовать такие вязкие коллоидные растворы в виде пропитки в раневых повязках. Кроме того, влажная среда, обеспеченная вязкими средами, также способствует быстрому заживлению ран [5].

В настоящей работе представлен анализ действия антибактериальных наносмазок на основе НЧ серебра, меди и селена в глицерине и силиконовом масле на одно- и многокомпонентные культуры грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* (SA),

¹ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: saraevain@lebedev.ru.

² НИЯУ «МИФИ», 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

Staphylococcus epidermis (SE), а также грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (ЕС), *Klebsiella pneumoniae* (КР) и *Pseudomonas aeruginosa* (РА). Впервые показан бактериостатический эффект НЧ, полученных методом одностадийной лазерной абляции в глицерине и силиконовом масле.

Экспериментальная часть. Массивные мишени Ag, Cu или Se располагались в стеклянной кювете под слоем (2 мм) деионизированной воды, глицерина (дистиллированный, пищевая добавка E442, “Glycerine Solutions”), или силиконового масла (техническая силиконовая смазка ПМС-100, “Комрек”), после чего лазерная система НТФ MARK (ОКБ Булат, Россия) с длиной волны 1064 нм и длительностью импульса 120 нс использовалась для генерации НЧ. Лазерное излучение фокусировалось на поверхность мишени с помощью F-theta объектива (фокусное расстояние $F = 70$ мм) в пятно диаметром ≈ 50 мкм, после чего производилось перемещение луча со скоростью $v_{\text{scan}} = 500$ мм/с, частотой повторения импульсов $f = 20$ кГц, энергией в импульсе $E = 0.9$ мДж в пределах области сканирования 15×10 мм² с заполнением 10 линий/мм и числом проходов 600.

Концентрация НЧ определялась путем взвешивания мишеней до и после абляции на прецизионных весах BM-20G (AND, Япония). Их визуализация и характеристика осуществлялась с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) (Tescan, Чехия), а также спектроскопии пропускания в видимом – ближнем ИК диапазонах (спектрофотометр СФ-2000, Россия). Размер НЧ определялся методом динамического рассеяния света (ДРС) (Photocor Compact, Россия).

Антибактериальные свойства вязких растворов, содержащих наночастицы, исследовались на примере планктонных культур SA, PA, EC, SE, KR и KR+SE. По 1 мл культуры каждого типа смешивался с 300 мкл коллоидного раствора и выдерживался в течение 1 ч в шейкере, в результате чего происходило интенсивное перемешивание бактериальных культур с наносмазками, далее производился смыв и высеивание бактерий с определением числа КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в миллилитре) и определение жизнеспособных бактерий методом окрашивания флюоресцентными красителями Live/dead Viability Kit.

Результаты и их обсуждение. СЭМ-изображения микро- и наночастиц, полученных в различных средах, представлены на рис. 1. Согласно СЭМ и ЭДС анализу все частицы обладают сферической формой, кроме НЧ селена, полученных в силиконовом масле (рис. 2(a)–(e)), которые представляли собой конгломераты наногл (рис. 2(f)).

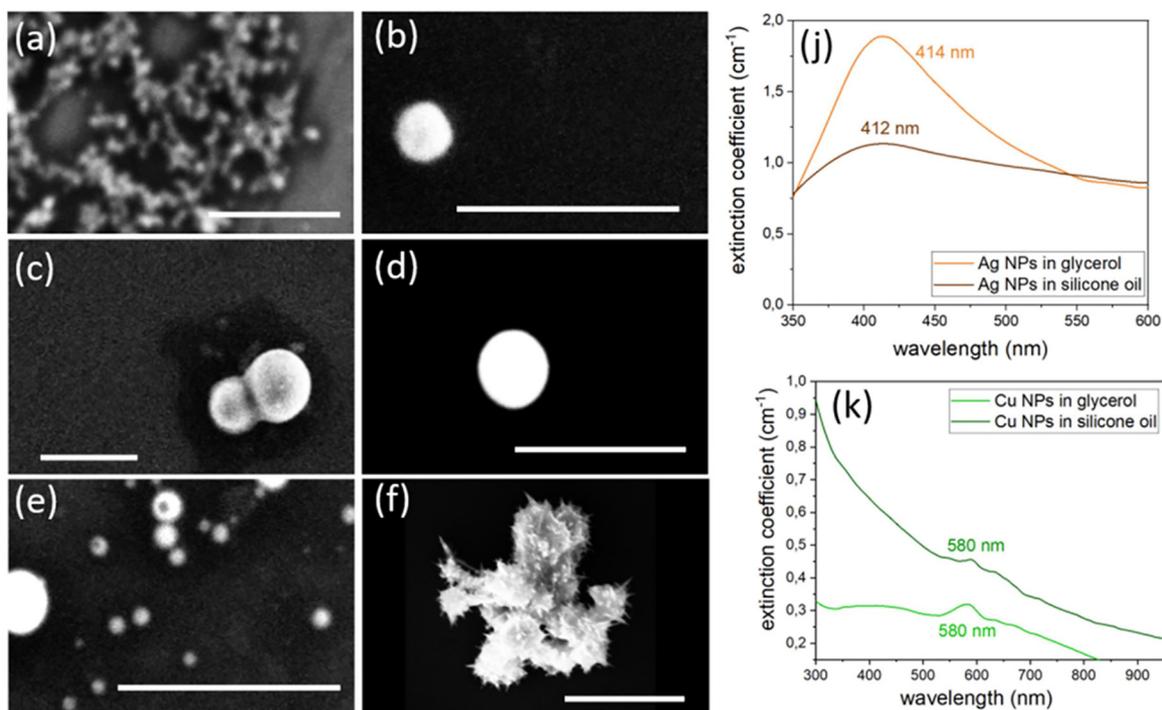


Рис. 1: СЭМ-изображение микро- и наночастиц серебра ((a), (b)), меди ((c), (d)) и селена ((e), (f)), полученных методом лазерной абляции в глицерине ((a), (c), (e)) и силиконовом масле ((b), (d), (f)); размерная метка соответствует 5 мкм. Спектры коэффициента экстинкции НЧ серебра (j) и меди (k) в глицерине и силиконовом масле.

В большинстве случаев НЧ, полученные методом лазерной абляции в органических средах, демонстрируют высокое содержание углерода в результате разложения растворителя. Спектры коэффициента экстинкции демонстрируют характерные полосы, соответствующие плазмонным резонансам в НЧ серебра и меди в областях 410 и 580 нм (рис. 2(j), (k)), соответственно. Для коллоидов НЧ селена наблюдалась малоинтенсивная полоса в области 550–600 нм.

Концентрация НЧ серебра составляла 3.8 мкг/мл, меди – 0.2 мкг/мл, селена – 4.0 мкг/мл. Размеры частиц варьировались от нано- до (суб)микромасштабных фракций (табл. 1).

Из данных табл. 1 следует, что лазерная абляция в силиконовом масле приводит к формированию субмикронных частиц. Микроразмерные фракции также наблюдаются после абляции в изопропиловом спирте, что связано с нестабильностью полученных растворов и быстрой агрегацией НЧ.

Т а б л и ц а 1

Размеры частиц, определенные методом ДРС

Тип коллоида	Размерная фракция 1, нм	Размерная фракция 2, нм	Размерная фракция 3, нм
Ag НЧ в воде	7 ± 1	96 ± 5	
Ag НЧ в изопропанолe	6 ± 1	129 ± 3	1853 ± 7
Ag НЧ в глицерине	35 ± 4		
Ag НЧ в силиконовом масле			1394 ± 9
Cu НЧ в воде	18 ± 2	469 ± 9	
Cu НЧ в изопропанолe	3 ± 1		
Cu НЧ в глицерине	3 ± 1	84 ± 2	
Cu НЧ в силиконовом масле		542 ± 8	
Se НЧ в воде	38 ± 4	315 ± 5	
Se НЧ в изопропанолe	2 ± 1		7579 ± 4
Se НЧ в глицерине		62 ± 3	
Se НЧ в силиконовом масле			3065 ± 7

Данные микробиологических посевов, выполненных для планктонных культур, представлены в табл. 2. Антибактериальные свойства наносмазок исследовались на примере планктонных культур *S. Aureus* (SA), *S. Epidermidis* (SE), *P. Aeruginosa* (PA), *E. Coli* (EC), *K. Pneumoniae* (KP) и *K. Pneumoniae + S. Epidermidis* (KP+SE). Обработка бактерий глицерином и силиконовым маслом без добавления НЧ не приводила к снижению их популяции. Видно, что формирование НЧ в вязких средах несколько снижает их антибактериальный эффект, тем не менее в общем случае приводя к снижению бактериальной обсемененности до семи порядков (табл. 2).

Согласно данным посевов наносмазки демонстрируют различный эффект на разные типы микроорганизмов. Так, обработка НЧ селена, полученными в силиконовом масле, не приводит к снижению популяции бактерий SE, однако вызывает снижение популяции KP на четыре порядка. В итоге в комбинированной культуре (KP+SE) также происходит снижение значения КОЕ/мл, что является немаловажным результатом. Возможно, эффект обоснован морфологией нано- и субмикрочастиц, а именно, механическим повреждением на остриях или вследствие проникновения наномасштабных фракций частиц через мембрану бактерий.

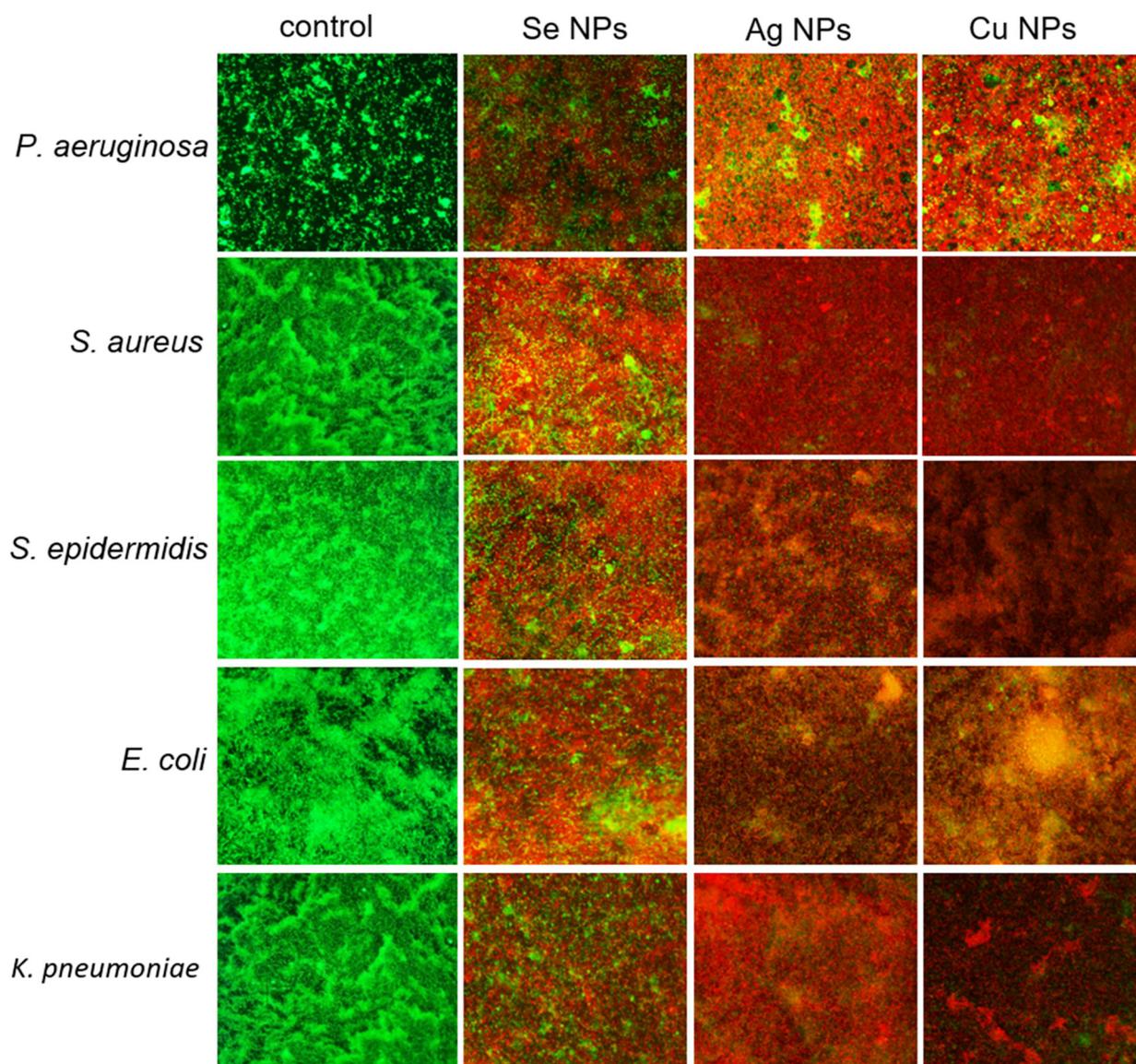


Рис. 2: Снимки флуоресценции окрашенных образцов, демонстрирующие жизнеспособность бактерий без аппликации НЧ (control, зеленый цвет) и после обработки НЧ селена, серебра и меди, где красным окрашены поврежденные клетки. Увеличение 600×.

Дифференциальное окрашивание с помощью набора “Live/Dead Viability Kit” демонстрирует количество выживших и погибших бактериальных клеток. Так, флуоресцентный краситель SYTO9 в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 450\text{--}490$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 515\text{--}565$ нм показывает зеленую эмиссию ДНК и РНК живых и мертвых бактерий. Интеркалирующий реагент иодид пропидия в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 546$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 575\text{--}640$ нм

показывает красную эмиссию ядер погибших бактерий. Согласно полученным результатам использование НЧ селена, серебра и меди демонстрирует высокий показатель бактериостатического действия, а именно: подавления и замедления роста и размножения бактерий (рис. 2).

Можно предположить, что основным механизмом антибактериального эффекта является механическое повреждение бактерий частицами определенной морфологии.

Т а б л и ц а 2

Результаты бактериологических посевов, демонстрирующие антибактериальный эффект наносмазков в значениях КОЕ/мл

	SA	SE	PA	EC	KP	KP+SE
Контроль	$7 \cdot 10^6 \pm 3.5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7 \pm 2.5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 \pm 2.5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^7 \pm 1.5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^5$
Ag НЧ в воде	$< 5 \pm 0.25$	0 ± 0.25	$< 5 \pm 0.25$	$< 5 \pm 0.25$	$6 \cdot 10^3 \pm 3 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$
Ag НЧ в глицерине	$4 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	5 ± 0.25	$2 \cdot 10^4 \pm 10^3$	$3 \cdot 10^2 \pm 15$	$5 \cdot 10^3 \pm 250$	$6 \cdot 10^3 \pm 3 \cdot 10^2$
Ag НЧ в силиконовом масле	$2 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^7 \pm 1.5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^5 \pm 1.5 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^4$
Cu НЧ в воде	$2 \cdot 10^2 \pm 10$	$8 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3 \pm 350$	$4 \cdot 10^2 \pm 20$	$4 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 \pm 5 \cdot 10^3$
Cu НЧ в глицерине	$3 \cdot 10^3 \pm 1.5 \cdot 10^2$	$8 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4 \pm 10^3$	$4 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$< 5 \pm 0.25$	$8 \cdot 10^4 \pm 4 \cdot 10^3$
Cu НЧ в силиконовом масле	$5 \cdot 10^6 \pm 2.5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7 \pm 5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6 \pm 1.5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5 \pm 1.5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^7 \pm 1.5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7 \pm 5 \cdot 10^5$
Se НЧ в воде	$7 \cdot 10^6 \pm 3.5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^7 \pm 2.5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 \pm 2.5 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^7 \pm 1.5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^5$
Se НЧ в глицерине	$2 \cdot 10^4 \pm 10^3$	$9 \cdot 10^3 \pm 450$	$1 \cdot 10^5 \pm 5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2 \pm 5$	$8 \cdot 10^4 \pm 4 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3 \pm 250$
Se НЧ в силиконовом масле	$7 \cdot 10^6 \pm 3.5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^7 \pm 5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 \pm 2.5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3 \pm 250$	$1 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^4$

Заключение. В настоящей работе продемонстрирована возможность получения вязких коллоидных растворов, содержащих наночастицы селена, серебра и меди, методом одностадийной лазерной абляции массивных мишеней этих материалов в глицерине и силиконовом масле. Показан бактериостатический эффект полученных наносмазкок на примере одно- и многокомпонентных культур грамположительных бактерий *S. Aureus*, *S. Epidermis*, а также грамотрицательных бактерий *E. Coli*, *K. Pneumoniae* и *P. Aeruginosa*. Полученные результаты демонстрируют возможность применения наносмазкок для снижения бактериальной обсемененности при лечении раневых инфекций.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00403, <https://rscf.ru/project/24-25-00403/>).

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] M. Frieri, K. Kumar, A. Boutin, *Journal of infection and public health* **10**(4), 369 (2017). DOI: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.
- [2] S. Tang, J. Zheng, *Advanced healthcare materials* **7**(13), 1701503 (2018). DOI: 10.1002/adhm.201701503.
- [3] S. Boroumand, M. Safari, E. Shaabani, et al., *Materials Research Express* **6**(8), 0850d8 (2019). DOI: 10.1088/2053-1591/ab2558.
- [4] M. Maliki, I. H. Ifjen, E. U. Ikhuoria, et al., *International Nano Letters* **12**(4), 379 (2022). DOI: 10.1007/s40089-022-00380-2.
- [5] K. Nuutila, E. Eriksson, *Advances in wound care* **10**(12), 685 (2021). DOI: 10.1089/wound.2020.1232.

Поступила в редакцию 26 ноября 2024 г.

После доработки 3 марта 2025 г.

Принята к публикации 5 марта 2025 г.