

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ
НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА В ОТНОШЕНИИ ГРИБОВ
*CANDIDA ALBICANS***

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Гуниной Виктории Валентиновны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук

С. А. Степанов

Саратов 2021

Введение

Актуальность темы. В современном мире существует огромное количество различных лекарственных средств, которые направлены на борьбу с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Появление устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к препаратам, которые приводят к резкому снижению эффективности лечения, является серьезной угрозой благополучию и здоровью человечества.

На сегодняшний день распространение антимикотиков носит глобальный характер. Актуальность и серьезность этой проблемы в полной мере подтверждена международным медицинским сообществом. В связи с этой проблемой актуальным является поиск альтернативных и эффективных методов лечения грибковых инфекций [1].

Современные препараты на основе наночастиц металлов не вызывают устойчивости микроорганизмов. В связи с этим одним из самых перспективных, современных и распространенных направлений лечения инфекционных болезней является использование нанотехнологий, в частности наночастиц металлов [2].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось определение антимикробной активности водных дисперсий наночастиц золота в отношении стандартного и клинических штаммов *Candida albicans*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить влияние различных концентраций химических веществ, используемых в качестве стабилизаторов водных дисперсий наночастиц золота, на выживаемость *C. albicans*.

2. Выявить влияние различных концентраций водных дисперсий наночастиц золота на стандартный и клинические штаммы *C. albicans*.

3. Провести сравнительный анализ эффективности водных дисперсий наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами, в отношении стандартного и клинических штаммов *C. albicans*.

Материал и методы исследования. Работа проводилась в 2019 - 2021 гг. на базе бактериологической лаборатории Саратовского областного клинического кожно-венерологического диспансера. В работе было использовано пять клинических штаммов *Candida albicans*, выделенных с кожи и слизистых оболочек людей, проходивших плановую диспансеризацию и стандартный штамм АТСС 885-653 был получен из ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Клинические штаммы были идентифицированы по фенотипическим свойствам согласно стандартным методикам [3].

В исследованиях использовали водные дисперсии наночастиц золота, которые были предоставлены ООО М9 (г. Тольятти). Предоставленные препараты являются экспериментальными и различаются по использованным в них стабилизаторам [4].

Серьезная проблема при получении коллоидных систем, содержащих наночастицы металлов, заключается в высокой поверхностной активности наночастиц и их способности агрегировать между собой, теряя биодоступность и биопроницаемость. Для устранения этой нежелательной реакции используют ряд методов, один из которых заключается в использовании различных веществ в качестве стабилизаторов. Природа стабилизатора определяет стабильность и морфологию наночастиц (состав, форму, размер). Известно большое количество способов стабилизации наночастиц металлов: стабилизация неорганическими соединениями, стабилизация органическими кислотами и спиртами, природными полимерами, стабилизация в полимерной матрице [5-7].

В исследуемых препаратах водных дисперсий наночастиц золота в качестве стабилизаторов использовались поливиниловый спирт, карбоксиметилцеллюлоза, олеат натрия, додецилсульфат натрия и полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ-м) [8, 9].

Концентрация наночастиц и стабилизаторов в препаратах подбиралась таким образом, чтобы концентрация макромолекул стабилизаторов была

соизмерима либо незначительно превышала концентрацию наночастиц, что, согласно литературным данным и рекомендации производителя, обеспечивает наилучший стабилизирующий эффект. Низкая концентрация карбоксиметилцеллюлозы была взята из-за очень высокой молекулярной массы биополимера [10, 11].

Штаммы *Candida albicans* культивировали на среде Сабуро в течение 24 ч. Из суточных культур по стандарту мутности готовили исходные взвеси (концентрация 10^9 м.к./ мл). Исходную взвесь каждого штамма методом последовательных разведений доводили до рабочей концентрации 10^4 м.к./ мл.

Далее определялась противогрибковая активность водных дисперсий наночастиц золота при различных концентраций: 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % от объема пробы. Для получения данных концентраций в колбы со 100 мл стерильного тёплого среды Сабуро добавляли по 0,0975, 0,195, 0,39, 0,78, 1,56 и 2,34 мл исходного препарата наночастиц. Сабуро с различными концентрациями наночастиц разливали по чашкам Петри.

Взвесь клеток (концентрация 10^4 м.к./ мл) по 100 мкл высевали газоном на поверхность среды Сабуро с наночастицами, культивировали при 37°C в течение 24 ч. Далее проводили количественный учёт выросших колоний. В качестве контроля использовали высев взвеси той же концентрации на среде Сабуро без добавления наночастиц и стабилизаторов.

Структура и объем работы. Работа изложена на 60 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 6 таблицами и 9 рисунками. Список использованных источников включает в себя 60 наименований.

Научная новизна. Впервые показана противогрибковая активность низкоконцентрированных водных дисперсий наночастиц золота в отношении стандартного и клинических штаммов *C. albicans*.

Научная значимость. Полученные результаты расширяют возможности использования водных дисперсий наночастиц золота в биологии и медицине позволяют проводить эффективную терапию грибковых инфекций.

Положения, выносимые на защиту.

1. Стабилизаторы водных дисперсий наночастиц золота не оказывают противогрибкового действия на грибы *C. albicans*.
2. Антимикробная активность водных дисперсий наночастиц золота носит дозозависимый характер и зависит от используемого стабилизатора.
3. Водные дисперсии наночастиц золота обладают фунгицидным действием по отношению к исследуемым штаммам грибов *Candida albicans*.

Основное содержание работы

В главе «Современные противогрибковые препараты в борьбе с устойчивостью условно-патогенных микроорганизмов» представлен анализ литературных данных о современных противогрибковых препаратах, об устойчивости микроорганизмов к противогрибковым препаратам, об антимикотических свойствах наночастиц золота и о биологических особенностях кандид.

В главе «Противогрибковая активность водных дисперсий наночастиц золота» представлены экспериментально полученные данные о выявлении противогрибковой активности соединений, использованных в качестве стабилизаторов водных дисперсий наночастиц золота.

На первом этапе исследования провели контрольный опыт со стабилизаторами водных дисперсий наночастиц золота, для исключения их противогрибковой активности. При анализе литературных данных, сведений о противогрибковой активности данных стабилизаторов не было обнаружено. В работах по изучению указанной теме – противогрибковой активности наночастиц металлов уже использовались некоторые из предоставленных нам стабилизаторов. Но авторы этих публикаций в своих работах не упоминали о предварительном изучении собственной

противогрибковой активности стабилизаторов. Поэтому, мы проверили все использованные в дальнейшей работе концентрации наночастиц.

Результаты показали, что концентрации стабилизаторов, использованные в водных дисперсиях наночастиц золота, поливинилового спирта от 4 до 100 мкг/ мл, карбоксиметилцеллюлозы от 0,05 до 1,5 мкг/ мл, олеата натрия, додецилсульфата натрия и ПААГ-М от 1 до 24 мкг/ мл не обладают противомикробными и фунгицидными свойствами и используются лишь для сохранения наноразмерной структуры и высокой бактерицидной активности частиц золота.

Концентрация стабилизаторов в препаратах наночастиц имеет большое значение. В водных дисперсиях наночастиц золота стабильность системы поддерживается только в том случае, когда концентрация макромолекул стабилизаторов соизмерима либо незначительно превышает концентрацию наночастиц. Когда концентрация макромолекул значительно превышает концентрацию частиц, продуктом реакции являются изолированные наночастицы металла, стабилизированные макромолекулами [12].

Для сохранения наноразмерной структуры в дальнейших экспериментах во всех разведениях количество стабилизатора не превышало количество наночастиц.

Результаты проведенных исследований показали, что антимикробная активность наночастиц золота, стабилизированных поливиниловым спиртом (Au/PVA/W 300) различна по отношению к исследуемым штаммам грибов.

Концентрации наночастиц 1 – 3 % проявляли фунгицидное действие на все исследуемые штаммы *C. albicans*.

Установлено, что наибольшей резистентностью к наночастицам, стабилизированным поливиниловым спиртом, обладали клинические штаммы № № 1, 3, 4, 5, которые выживали при концентрации 0,5 %. Численность этих штаммов при указанной концентрации составляла от 40 до 80 КОЕ/чашка.

Самым чувствительным оказался стандартный штамм ATCC 885-653,

численность клеток которого снижалась до 64 и 188 КОЕ/чашка при концентрациях 0,25 и 0,125 % соответственно, а концентрация наночастиц 0,5 % оказывала на него фунгицидное действие.

При культивировании стандартного и клинических штаммов *C. albicans* на среде с добавлением наночастиц золота, стабилизированных природным полимером карбоксиметилцеллюлозой, было показано, что только высокие концентрации 2 – 3 % оказывали фунгицидное действие в отношении всех используемых штаммов.

При концентрации наночастиц золота, стабилизированных полимером карбоксиметилцеллюлозой, равной 1 %, наблюдался рост только клинических штаммов *C. albicans* № 2 и № 4. Численность штаммов при указанной концентрации составила 28 и 8 КОЕ/чашка соответственно. Стандартный штамм *C. albicans* ATCC 885-653 и клинические штаммы № № 1, 3, 5 оказались чувствительны к концентрации наночастиц 1 %, которая оказала на них фунгицидное действие.

Максимальное фунгицидное действие исследуемые наночастицы золота Au/СМС/W 300 оказали на штамм № 1, его численность снижалась до 84, 128 и 498 КОЕ/чашка при концентрациях 0,5, 0,25 и 0,125 % соответственно.

Отличительной особенностью препарата наночастиц золота, стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой Au/СМС/W 300 было то, что в нём стабилизатор присутствовал в значительно меньшем количестве, чем в других препаратах. Производитель мотивировал это тем, что данный полимер имеет очень большую молекулярную массу, поэтому предполагалось, что он будет оказывать необходимый эффект даже в низких концентрациях.

Наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия (Au/OleNa/W 300), характеризовались более низким уровнем фунгицидной активности, которая наблюдалась в отношении всех исследуемых штаммов только при концентрациях 2 – 3 % .

Наиболее чувствительными к концентрации наночастиц 1 % оказались клинические штаммы №№ 4 и 5, при указанной концентрации рост штаммов отсутствовал.

Концентрации наночастиц золота 0,125 – 0,5 % вызывали значительное снижение КОЕ всех исследуемых штаммов до значений 672 и 268 КОЕ/чашка соответственно.

Наночастицы золота, стабилизированные додецилсульфатом натрия (Au/SDS/W 300), оказывали фунгицидное действие в отношении всех исследуемых штаммов грибов *S. albicans* при концентрациях 1 – 3 %.

При концентрации наночастиц золота 0,5 % наиболее устойчивыми оказались стандартный штамм ATCC 885-653 и клинические штаммы №№ 2 и 4, их численность снижалась до 94, 110 и 84 КОЕ/чашка соответственно. На остальные штаммы концентрация наночастиц 0,5 % оказывала фунгицидное действие.

Концентрации наночастиц золота 0,125 – 0,5 % вызывали значительное снижение КОЕ всех исследуемых штаммов до значений 506 и 202 КОЕ/чашка соответственно.

Высокой эффективностью антимикробного действия характеризовались наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода (Au/PG-m/W 300).

Противогрибковый характер действия в отношении всех исследуемых штаммов грибов *S. albicans* был установлен для наночастиц золота в диапазоне концентраций 0,5 - 3 %.

Концентрации наночастиц золота 0,125 – 0,25 % вызывали значительное снижение КОЕ всех исследуемых штаммов до значений 216 и 24 КОЕ/чашка соответственно.

Наибольшая чувствительность к наночастицам золота, стабилизированным полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, при концентрациях 0,125 % и 0,25 % выявлена у клинического

штамма *C. albicans* № 3, численность которого составила 126 и 24 КОЕ/чашка соответственно.

Важным этапом работы являлся сравнительный анализ эффективности водных дисперсий наночастиц золота, стабилизированных различными полимерами, в отношении стандартных и клинических штаммов грибов *C. albicans*. На основании анализа полученных экспериментальных данных можно констатировать, что на выживаемость грибов *C. albicans* оказывают влияние исследуемые препараты, используемые в диапазоне рабочих концентраций, при этом штаммовые различия, как правило, носят недостоверный характер. Таким образом, можно предположить, что исследуемые препараты будут оказывать сходное действие на различные штаммы *C. albicans*.

Данные наночастицы золота, стабилизированные различными природными и синтетическими полимерами, можно разделить на группы по эффективности в отношении условно-патогенных грибов *C. albicans*.

В первую группу входят наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия и карбоксиметилцеллюлозой, которые показали низкую фунгицидную активность по отношению ко всем штаммам грибов *C. albicans*. Они вызывали гибель клеток только при концентрациях 2 - 3 %. Низкий уровень противогрибковой активности, вероятно, связан с низкой стабилизирующей эффективностью олеата натрия, поскольку оценка гидродинамического размера и динамика агрегации наночастиц показала высокую скорость этого процесса.

Во вторую группу входят наночастицы золота, стабилизированные поливиниловым спиртом и додецилсульфатом натрия. Они вызывали гибель грибов *C. albicans* при концентрациях от 1 до 3 %. При остальных концентрациях они оказывали частично фунгицидное действие. Чувствительность исследуемых штаммов *C. albicans* к действию наночастиц золота, стабилизированных додецилсульфатом натрия, связана с высокой токсичностью стабилизатора, которая была ранее установлена для него в

отношении биотест-объектов.

В третью группу входили наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода. Они показали наибольшую противогрибковую активность в отношении грибов *C. albicans*. Летальные концентрации наночастиц, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода, лежали в диапазоне от 0,5 до 3 %.

Таким образом, можно сделать вывод, что водные дисперсии наночастиц золота обладают фунгицидным действием по отношению к исследуемым штаммам грибов *Candida albicans*. Наиболее эффективным для дальнейших исследований является препарат наночастиц золота, стабилизированных полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода.

Выводы

1. Природные и синтетические полимеры, используемые в качестве стабилизаторов водных дисперсий наночастиц золота, в рекомендуемых концентрациях не оказывают противогрибкового действие на выживаемость стандартного и клинических штаммов *Candida albicans*.

2. Наименьшей противогрибковой активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *C. albicans* обладают наночастицы золота, стабилизированные олеатом натрия (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % - на 42 %).

3. Наибольшей противогрибковой активностью по отношению к стандартному и клиническим штаммам *C. albicans* обладают наночастицы золота, стабилизированные полиазолидинаммонием, модифицированным гидрат-ионами йода (снижение КОЕ при наименьшей концентрации 0,125 % - на 87 %)

Список использованных источников

- 1 Федюкович, Н. И. Фармакология: учебник / Н. И. Федюкович, Э. Д. Рубан. – Ростов на Дону: Феникс, 2013. – 700 с.
- 2 Иванова, Е. В. Антимикотики, история и перспектива развития, как направление в 2020 г. / Е. В. Иванова, Г. В. Цаплин // StudNet. – 2020. – № 10. – С. 20 – 27.
- 3 Наночастицы золота и серебра и наноструктуры на их основе. Синтез, свойства и перспективы применения в медицине / О. В. Дементьева [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2016 – № 3. – С.50 – 65.
- 4 Сравнительная оценка чувствительная к противогрибковым препаратам клинических штаммов *Candida Albicans* и *Non- Albicans*, выделенных при кандидозных кольпитах / И.С. Азизов [и др.] // Успехи медицинской микологии – 2015. – Т.14, №5. – С. 176–179.
- 5 Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам / И. О. Покудина [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 10. – С. 50 – 63.
- 6 Кеменов, В. Н. Нанотехнологии, биология и медицина / В. Н. Кеменов, С. Б. Нестеров // МИЭМ. – 2002. – № 2. – С. 248 – 253.
- 7 Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Бычковский, П. М. [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – № 2. – С. 20 – 26.
- 8 Воробьев, А. В. Микробиология / А. В. Воробьев, А. С. Быков, Е. П. Пашков. – М.: Медицина, 2012. – 336 с.
- 9 Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам / Т. А. Гренкова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 5. – С. 12 – 20.
- 10 Антибиотикорезистентность: эволюционные предпосылки, механизмы, последствия / О. И. Захарова [и др.] // Аграрная наука Евро–Северо–Востока. – 2018 – № 4. – С. 95 – 110.

11 Дыкман, Л. А. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы / Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2017. – № 3. – С. 26 – 35.

12 Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М. : Наука, 2004. – 528 с.