

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И ОКИСЛЕННОГО ГРАФЕНА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИ АБЕРРАНТНЫЕ ФОРМЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

КОРОЧКИН Р.Б., КРАСОЧКО П.А., ПОНАСЬКОВ М.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам в настоящее время стала серьезной проблемой. Одним из фенотипических проявлений антибиотикорезистентности у микроорганизмов является приобретение ими альтернативных aberrантных морфологических вариаций, связанных с адаптацией к росту в неблагоприятной среде. Растущая потребность в антимикробных средствах для лечения клинических случаев, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, привлекла исследователей к нанотехнологиям. В настоящее время наноразмерные материалы появились в качестве новых противомикробных агентов из-за многогранного интегрированного механизма действия. В данной статье авторы изучили один из возможных сценариев морфологической пластичности у кишечной палочки и характер цитолитического воздействия на aberrантные формы бактерии наночастиц серебра и окисленного графена.

Ключевые слова: морфологическая пластичность, антибиотики, наночастицы серебра, наночастицы окисленного графена, микроскопия.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF SILVER AND OXIDE GRAPHENE NANOPARTICLES ON MORPHOLOGICALLY ABERRANT FORMS OF ESCHERICHIA COLI

KOROCHKIN R.B., KRASOCHKO P.A., PONASKOV M.A.

Vitebsk State Academy Of Veterinary Medicine,
Vitebsk, Republic of Belarus

Antibiotic resistance of pathogenic bacteria has now become a serious problem. One of the phenotypic manifestations of antibiotic resistance in microorganisms is the acquisition of alternative aberrant morphological variations associated with adaptation to growth in an antibioticly unfavorable environment. The growing need for antimicrobial agents to treat clinical cases caused by multidrug-resistant microorganisms has attracted researchers to nanotechnology. Currently, nanoscale materials have emerged as new antimicrobial agents due to the multifaceted integral mechanism of action. In this article, the authors studied one of the possible scenarios of morphological plasticity in Escherichia coli and the cytolytic effect on aberrant forms of bacteria of silver nanoparticles and oxidized graphene.

Keywords: morphological plasticity, antibiotics, silver nanoparticles, oxidized graphene nanoparticles, microscopy.

Введение. Микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью, становятся основной причиной инфекций среди людей и животных. Мультирезистентные штаммы микроорганизмов иногда могут демонстрировать уникальный фенотип. В частности, нами ранее было установлено, что морфологические варианты бактерий, связанные с появлением нитевидных aberrантных форм кишечной палочки, имеют корреляцию с появлением множественной антибиотикорезистентности [1,2]. Выделенные нами из различного биоматериала изоляты *E. coli* характеризовались высокой степенью филаментации, что сопровождалось значительной устойчивостью микроорганизма к различным классам антибиотикам как в условиях *in vivo*, так ее демонстрацией в лабораторных условиях *in vitro*. В этой связи возможные варианты клинического применения антибиотиков при инфекциях, вызванных мультирезистентными микроорганизмами, часто ограничены. Данная проблема

обосновывает острую потребность в альтернативных и эффективных противомикробных стратегиях.

Морфологическая вариативность, или иначе пластичность бактерий – это малоизученный феномен, с помощью которого бактерии приобретают адаптивные преимущества для приспособления к неблагоприятным условиям окружающей среды. Как предполагается, филаментация бактерий происходит, когда их рост продолжается без деления клеток, что приводит к образованию удлинённых микроорганизмов с множественными копиями хромосом. Считается, что образование морфологически аберрантных разновидностей микроорганизмов, в частности, с характерной нитевидной морфологией, является адаптивной стратегией выживания бактерий при действии различных стрессоров окружающей среды, включая факторы хозяина, фагоцитоз со стороны протистных хищников, повышение гидростатического давления и антимикробную терапию [3, 6]. В лабораторных условиях удавалось получать нитевидные формы бактерий путем воздействия антибиотиков, которые ингибируют деление клеток, но позволяют клеткам расти с постоянной экспоненциальной скоростью до тех пор, пока рост не будет прекращен вследствие лизиса клеток [7].

Нанотехнологии с применением наноразмерных материалов все чаще используются в клинических целях, особенно в качестве новой парадигмы терапии инфекционных заболеваний, в том числе в ветеринарной сфере. Наночастицы могут проникать через клеточную мембрану патогенных микроорганизмов и взаимодействовать с их метаболизмом, влиять на важные биохимические процессы, инициируя уникальные противомикробные механизмы, недоступные для классической антибиотикотерапии. Рост устойчивости бактерий к противомикробным препаратам способствовал исследованиям антибактериальных наноматериалов, особенно в хорошо известной области ионов серебра и его соединений, включая наночастицы этого металла. Однако, данный тип наночастиц, демонстрируя уникально высокие антимикробные качества, характеризуется весьма удовлетворительной, зачастую низкой биосовместимостью, что значительно ограничивает их применение в медицине и ветеринарии. В последнее время возрос интерес к созданию наночастиц на основе базового биологического элемента – углерода.

Материалы и методы исследований. В качестве основного объекта изучения являлись полевые изоляты кишечной палочки, идентифицированные по биохимическим тестам, которые проявляли заметную морфологическую аберрантность в виде образования устойчивых филаментных форм. Данный морфологический феномен коррелировал с множественной антибиотикорезистентностью, выявленной *in vitro*, что было связано с длительным применением антибиотиков цефалоспоринового ряда *in vivo* на животных в производственных условиях. Другим объектом исследования являлись лабораторный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922, поддерживаемый в олиготрофных абиотических (без присутствия антибиотиков) условиях.

В качестве тестируемых антибактериальных компонентов были использованы коллоидные растворы наночастиц окисленного графена и серебра, а также антибиотики пенициллинового (ампициллин), макролидного (эритромицин), аминогликозидного (гентамицин) и цефалоспоринового (цефтриаксон) ряда. Все использованные образцы коллоидов имели стабильные физико-химические характеристики. Размер наночастиц окисленного графена лежал в пределах 100–120 нм (исходная концентрация 600 мкг·мл⁻¹), размер наночастиц серебра имел размер до 20 нм (300 мкг·мл⁻¹).

Антибактериальное действие определяли классическим диффузионным методом по методике Кирби-Бауэра [3]. Морфологические характеристики бактерий определяли с помощью световой микроскопии после окраски по Граму в классическом исполнении. Цитотоксические эффекты наночастиц оценивали путем анализа микрофотографий микробных клеток, полученных методом атомно-силовой микроскопии после соответствующей экспозиции.

Результаты исследований. Первоначально были исследованы морфологические характеристики полевых штаммов *E. coli*, изолированных из биоматериала от телят и свиней, которые подвергались многократному метафилактическому лечению антибиотиками цефалоспоринового ряда. Выделенные изоляты кишечной палочки имели нетипичную для этого вида микроорганизма филаментную морфологию. Размер бактериальных клеток

превышал таковой типичных форм в 10–50 раз, сохраняя грамотрицательную тинкториальную принадлежность. В течение всего срока наблюдения микроорганизм сохранял аберрантную морфологию при культивировании в олиготрофной среде.

На следующем этапе мы постарались изучить возможность приобретения морфологической аберрации кишечной палочкой в лабораторных условиях. С этой целью проводили четырехкратное культивирование штамма *E. coli* ATCC 25922 на плотной питательной среде Мюллера-Хинтона с добавлением антибиотиков (ампициллин, эритромицин, гентамицион, цефтриаксон) с параллельным контролем морфологии и антибиотиковой чувствительности штамма в каждом новом пассаже. Для пересева отбирали колонию микроорганизма на границе зоны ингибиции роста, где ожидалась параингибирующая концентрация используемого антибиотика. При оценке морфологических свойств штамма была обнаружена морфологическая трансверсия культуры, наблюдаемая в первом и всех последующих пассажах в присутствии антибиотиков ампициллин и цефтриаксон, хотя при контрольном культивировании в абиотической олиготрофной среде штамм сохранял свою типичную палочковидную морфологию.

В наибольшей степени морфологическая гетерогенность культуры отмечалась в конце наблюдения (четвертый пассаж). Изучение морфологических свойств лабораторного штамма кишечной палочки выявило некоторую тенденцию нарастания морфологической диссоциации культуры с повышением ее фенотипической гетерогенности с каждым новым пассажем. Тем не менее, достижения культурой лабораторного штамма *E. coli* ATCC 25922 полной морфологической гомогенности отмечено не было: при высокой степени гетерогенности фенотипически аберрантные формы микроорганизмы составляли до половины всей микроскопируемой микробной популяции, что приблизительно соответствовало степени морфологической гетерогенности полевого изолята кишечной палочки.

Сравнение степени морфологически модулирующего эффекта двух антибиотиков из числа тестируемых (ампициллин и цефтриаксон) не проводилось в силу субъективности такого наблюдения. Обращает лишь на себя внимание то, что оба препарата имеют схожий механизм действия, связанный с подавлением синтеза бактериальной мембраны [2]. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что в полевых условиях антибиотикотерапии морфологическая пластичность кишечной палочки сопровождалась бесконтрольным применением антибиотиков цефалоспоринового ряда, к которым принадлежит цефтриаксон. из числа использованным нами в *in vitro*-опыте.

После световой микроскопии филаментных форм кишечной палочки мы провели атомно-силовую микроскопию бактериальных культур с аберрантной морфологией, а также цитотоксический эффект на них тестируемых наночастиц. Микрофотографии подтвердили наличие аберрантной морфологии лабораторного штамма *E. coli* ATCC 25922, достигнутого многократным действием субингибирующих концентраций антибиотиков. Длина отдельной филаментной клетки превышала 24 мкм, что контрастировало с канонической морфологией *E. coli*, наблюдаемой в контрольном образце.

На заключительном этапе наших исследований нами проведена оценка цитотоксических свойств наночастиц серебра и окисленного графена на филаментные варианты кишечной палочки полевого и лабораторного штамма *E. coli* ATCC 25922. В ранее проведенных исследованиях нами установлено, что наночастицы названных веществ оказывают цитолитическое действие на канонические морфологические варианты *E. coli* с цитотоксической концентрацией 25 мкг·мл⁻¹ и 75 мкг·мл⁻¹ для наночастиц серебра и окисленного графена, соответственно. В опыте культуры филаментных форм кишечной палочки полевого изолята и лабораторного штамма подвергли 45-ти минутному воздействию коллоидных растворов в названных концентрациях с визуальной оценкой морфологии культур в атомно-силовом микроскопе.

При атомно-силовой микроскопии микропрепаратов культур кишечной палочки, обработанных надтоксическими концентрациями наночастиц, нами отмечены цитолитический эффект наночастиц серебра и окисленного графена. Он выражалась в тотальной деструкции исходной аберрантной морфологии культур микроорганизма, потере клетками контуров,

снижением уровня пространственной контрастности сканируемых объектов, что соответствовало характеру морфологической деструкции культур одноименного организма канонической морфологии.

Сравнение морфологической картины микробной популяции кишечной палочки при воздействии супратоксических концентраций наночастиц выявил несколько более выраженный цитолитический эффект, связанный с действием наночастиц серебра, в сравнении с таковыми окисленного графена. Авторы не ставили перед собой задачу сравнения характера цитотоксических эффектов двух видов наночастиц между собой ввиду субъективности такой оценки, однако картина морфологической деструкции у полевого изолята кишечной палочки и лабораторного штамма *Escherichia coli* ATCC 25922 в целом была однозначной.

Заключение. Проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Морфологическая пластичность микроорганизмов, выражающаяся в приобретении ими абберрантных морфологических вариантов, является фенотипическим выражением их адаптации к росту в неблагоприятных условиях.

2. Филаментные морфологические варианты кишечной палочки могут быть индуцированы при длительном использовании антибиотиков *in vivo*, а также при воздействии субингибирующих концентраций антибиотиков цефалоспоринового ряда.

3. Наночастицы серебра и окисленного графена в цитотоксических концентрациях оказывают одинаковый цитолитический эффект на канонические и абберрантные формы кишечной палочки, незначительно отличаясь между собой по характеру цитолитичности.

Литература

1. Антибиотикоиндуцированная морфологическая пластичность кишечной палочки, изолированной от животных / Р. Б. Корочкин [и др.] // *Ветеринария Кубани*. – 2019. – №5. – С. 15–17.

2. Дифференциальная диагностика болезней сельскохозяйственных животных / А. И. Ятусевич, П. А. Красочко, В. В. Максимович [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2021. – 808 с. – ISBN 978-5-907430-77-8. – EDN KEMFFU.

3. Инфекционные болезни животных, регистрируемые в Союзном государстве / П. А. Красочко, Н. И. Гавриченко, О. Ю. Черных [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Чеченский государственный университет, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2020. – 385 с. – ISBN 978-5-907373-70-9. – EDN NVEVJY.

4. Лекарственные препараты в России : справочник ВИДАЛЬ, 2003. – 9-е изд., испр. и доп. – Москва : АстраФармСервис, 2003. – 1472 с. : ил., табл

5. Оценка бактериоингибирующего действия нано- и коллоидных частиц серебра и кремния диффузионным методом / П. А. Красочко [и др.] // *Ветеринария Кубани*. – 2019. - № 4. – С. 15–17.

6. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy / S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegelski, S. J. Hultgren // *Nature Reviews Microbiology*. – 2008. – Vol. 6, P. 162–168.

7. Rolinson, G. N. Effect of beta-lactam antibiotics on bacterial cell growth rate / G. N. Rolinson // *The Journal of General Microbiology*. – 1980. – Vol. 120. – P. 317–323.