

УДК 579.620.3:57.085

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Бабушкина И.В., Гладкова Е.В., Мамонова И.А., Норкин И.А., Пучиньян Д.М.
*ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»
Минздрава России, Саратов, e-mail: 10051968@mail.ru*

В работе представлены результаты изучения влияния суспензии наночастиц меди в изотоническом растворе хлорида натрия на регенерацию экспериментальной условно-асептической раны. У животных опытной группы отмечены быстрое уменьшение площади раны по данным планиметрических исследований (суточного и общего уменьшения площади раны, изменение скорости заживления ран), нормализация гематологических и биохимических показателей в ранние сроки. Морфометрическое изучение характеристик раневой поверхности также подтверждает улучшение репаративных процессов в экспериментальной ране. В работе показано выраженное профилактическое действие суспензии наночастиц меди в отношении вторичного инфицирования раны, что подтверждается данными бактериологических исследований. Суспензия наночастиц меди может быть рекомендована для лечения повреждений покровных тканей в качестве средства, оптимизирующего репаративную регенерацию и обладающего антибактериальным действием.

Ключевые слова: экспериментальная полнослойная рана, наночастицы меди

EXPERIMENTAL RESEARCH OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF COPPER NANOPARTICLES

Babushkina I.V., Gladkova E.V., Mamonova I.A., Norkin I.A., Puchinyan D.M.
*Federal Government-Financed Institution «Saratov Research Institute of Traumatology
and Orthopaedics» of Ministry of Public Health of the Russian Federation,
Saratov, e-mail: 10051968@mail.ru*

This work presents the results the research on copper nanoparticles influence on experimental wounds. In accordance with planometric analysis animals of experimental group have shown fast diminution of wound surface (wound surface adjustment, wound healing pace, daily involution of wound surface), haematological and biochemical indicants normalization. Morphometric survey of wound surface characteristics has also proved reparative process optimization in experimental wounds. The work states evident prophylactic effect of copper nanoparticles in secondary contamination of wounds which is also supported by laboratory test results. Coarse dispersion of copper nanoparticles can be recommended for investing tissue trauma treatment.

Keywords: experimental full thickness wound, copper nanoparticles

Репаративная регенерация является сложным многоступенчатым процессом, в основе которого лежит комплекс биохимических, иммунологических и генетических механизмов. Несмотря на большое количество средств природного и синтетического происхождения, обладающих репаративными свойствами, проблема остается актуальной, так как существующие препараты не всегда достаточно эффективны [4, 5]. Литературные данные также свидетельствуют об актуальности и нерешенности проблемы профилактики хирургической инфекции, приобретающей все большую социально-экономическую значимость [3, 7].

Научно-практический интерес к исследованию биологической активности наночастиц меди определяется возможностью использования их в качестве регенерирующих и антибактериальных препаратов [4, 8, 9]. Медь играет важную роль в жизнедеятельности организма, оказывает катализирующее влияние на процессы полноценной регенерации тканей [2]. Несмотря на несомненную перспективность исследований в данной области, в литературе встре-

чаются лишь отдельные работы, посвященные изучению влияния наночастиц меди на заживление ран.

Целью исследования явилась комплексная оценка репаративной регенерации в условиях условно-асептической экспериментальной раны под влиянием суспензии наночастиц меди.

Материалы и методы исследования

В работе использовали нанопорошки меди, синтезированные на плазмохимическом комплексе филиала Федерального Государственного Управления РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС г. Москва). Объектом исследования явились 60 белых крыс-самцов, массой 130–140 г, у которых формировали полнослойную кожную рану размером 400 мм² в межлопаточной области. Животные были разделены на 3 группы по 20 крыс в каждой: контрольная группа – интактные животные; группа сравнения – крысы с полнослойной кожной раной, рана заживала естественным путем; опытная группа – крысы с полнослойной кожной раной, получавшие лечение суспензией наночастиц меди.

Модель экспериментальной раны была получена следующим образом [6]: после предварительной

обработки кожи, в асептических условиях, под наркозом, на выбритом от шерсти участке в межлопаточной области у крыс по контуру, предварительно нанесенному трафаретом, иссекали кожу с подкожной клетчаткой в виде квадрата 2×2 см (400 мм²).

На раневую поверхность животных опытной группы ежедневно накладывали стерильные салфетки, смоченные 1,0 мл суспензии наночастиц меди в изотоническом растворе хлорида натрия в концентрации 0,01 мг/мл.

Для оценки эффективности лечения использовали экспериментальные, планиметрические, гематологические, гистологические, микробиологические и статистические методы.

Использовали планиметрический метод Л.Н. Поповой, основанный на регистрации скорости уменьшения раневой поверхности во времени: на рану помещали стерильную прозрачную пластинку полимера, на которую наносили контур раны, и считывали изображение с помощью сканера HP Scanjet 3970. Площадь раны рассчитывали с помощью компьютерной программы ImageJ.

Процент уменьшения площади раны за сутки определяли по формуле:

$$\frac{(S - S_n) \cdot 100}{S \cdot t},$$

где S – площадь раны при предыдущем измерении; S_n – площадь раны при данном измерении; t – число дней между первым и последующим измерениями. Скорость заживления раны высчитывали по формуле:

$$CЗ = \frac{S - S_n}{n},$$

где $CЗ$ – скорость заживления площади раны в сутки; S – исходная площадь раны; S_n – площадь раны к сроку измерения; n – количество суток.

Изучение гематологических показателей проводили на анализаторе Micros 60 ABX (Франция).

Препараты срезов кожи для гистоморфологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрию раневой поверхности проводили на микроскопе Revelation III Sky Optic (10×40) с целью изучения динамики репаративных процессов в данных группах животных. В срезах кожи измеряли толщину эпидермиса по вертикали от базальной мембраны до рогового слоя (клеточный эпидермис), а также дермы. Исследовали по одному срезу от каждого животного. Подсчеты производили во всех полях зрения (20–25 полей зрения на срез), при этом в каждом поле зрения было сделано по три измерения. В каждой группе выполняли не менее 150 измерений соответствующего параметра.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Statistica 6.0», предназначенной для оценки результатов медицинских и биологических наблюдений, с вычислением средней арифметической (M), среднеквадратического отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической (m), коэффициента достоверности (t), показателя вероятности (p).

Результаты исследования и их обсуждение

Во всех сериях экспериментов на 1-е сутки после моделирования условно-асептической раны средняя площадь ран, по данным планиметрического метода исследования, составила около 400 мм². Изменения площади раневой поверхности опытной группы и группы сравнения в динамике отражены в табл. 1.

Таблица 1

Изменения площади раневой поверхности у экспериментальных животных в динамике наблюдения

Группы животных	Площадь экспериментальной раны (мм ²) после её моделирования на					
	1-е	3-и	5-е	7-е	10-е	14-е
	сутки					
Сравнения ($n = 20$)	387,3 ± 2,4	408,7 ± 11,3	359,5 ± 14,3	359,5 ± 14,3	188,6 ± 10,3	74,3,1 ± 6,3
Опытная ($n = 20$)	403,3 ± 9,2	325,3 ± 3,2 $p < 0,05$	98,3 ± 7,3 $p < 0,001$	38,1 ± 5,9 $p < 0,001$	11,3 ± 3,5 $p < 0,001$	0,0

Примечание. p – уровень достоверности различий данных опытной группы по отношению к группе сравнения.

У всех животных группы сравнения полного заживления экспериментальной раны не произошло к 14-м суткам наблюдения: в среднем к этому сроку площадь раны в группе сравнения уменьшилась на 78%. У животных опытной группы уже на 7-е сутки площадь раны сократилась на 83,1%, а к 14-м суткам раны полностью эпителизировались. Таким образом, суспензия наночастиц меди оказывала выраженное стимулирующее влияние на динамику регенерации экспериментальных ран у животных опытной группы.

Следует отметить, что у пяти крыс группы сравнения на 7-е сутки исследования было отмечено увеличение площади раны на 10–27% по отношению к исходным показателям. При бактериологическом исследовании у данных животных идентифицировали *Escherichia coli* в количестве $5,3 \pm 1,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Края ран были гиперемизированными и отечными за счет вторичного их инфицирования, приводящего к увеличению раневой поверхности. У всех животных опытной группы, получавших лечение наночастицами меди,

экспериментальные раны заживали без признаков вторичного инфицирования.

Максимальная скорость заживления экспериментальной раны у животных опытной группы на 5-е сутки (112,8 мм/сут) существенно превышала аналогичные показатели (35,1 мм/сут) в группе сравнения ($p < 0,001$).

Анализ суточного уменьшения площади ран в процентах показал, что применение наночастиц меди вызывает максимальное сокращение площади экспериментальной раны на 7–10-е сутки после её моделирования (на 27%), затем среднее суточное уменьшение площади ран несколько снижается до 14%. На наш взгляд, это связано с тем, что у части животных завершилась эпителизация ран. Различие между двумя группами животных по показателю средней скорости уменьшения площади ран было достоверно ($p < 0,001$) на всех сроках наблюдения, что

доказывает высокую регенеративную эффективность наночастиц меди в виде суспензии.

Данные лейкоцитарной формулы животных опытной группы и группы сравнения на 14-е сутки наблюдения продемонстрировали различную степень выраженности общевоспалительной реакции организма крыс (табл. 2). Так, у животных группы сравнения отмечалось существенное увеличение количества палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофильных лейкоцитов, а также общее число лейкоцитов по отношению к животным опытной группы, получавшим лечение суспензией наночастиц меди. В опытной группе эти показатели были близки к таковым в контрольной группе. Интересно отметить, что к 14-м суткам эксперимента количество лимфоцитов в опытной группе и группе сравнения было существенно ниже их содержания у контрольных животных.

Таблица 2

Лейкоцитарная формула животных на 14-е сутки наблюдения

Группы	Количество лейкоцитов, $10^9/л$	Палочкоядерные нейтрофилы, %	Сегментоядерные нейтрофилы	Лимфоциты
Контрольная	$12,7 \pm 4,8$	$6,3 \pm 2,3$	$21,3 \pm 4,3$	$61,8 \pm 4,3$
Сравнения	$27,1 \pm 3,2$ $p_{1-2} < 0,05$	$15,3 \pm 2,7$ $p_{1-2} < 0,05$	$34,8 \pm 5,1$ $p_{1-2} < 0,05$	$33,6 \pm 2,5$ $p_{1-2} < 0,001$
Опытная	$18,6 \pm 4,1$ $p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$	$10,4 \pm 4,3$ $p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,001$	$23,4 \pm 4,5$ $p_{1-2} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$	$38,3 \pm 3,2$ $p_{1-2} < 0,001$ $p_{2-3} > 0,05$

Пр и м е ч а н и я : p_{1-2} – уровень достоверности различий показателей группы сравнения по отношению к контрольной группе; p_{2-3} – уровень достоверности различий показателей опытной группы по отношению к группе сравнения.

Объективными показателями при изучении репаративной активности кожи крыс выступают морфометрические показатели раневой поверхности. Ниже приведены результаты измерения в динамике толщины

эпидермиса и дермы в области экспериментальной раны и определения отношения толщины эпидермиса к толщине дермы у животных групп сравнения и опытной группы (табл. 3).

Таблица 3

Толщина слоев кожи экспериментальных животных в области раны на 21-е сутки

Показатель	Группы животных		
	Контрольная ($n = 20$)	Сравнения ($n = 20$)	Опытная ($n = 20$)
Толщина эпидермиса, мкм	$27,4 \pm 5,2$	$45,9 \pm 3,8$ $p_{1-2} < 0,001$	$26,8 \pm 4,5$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,01$
Толщина дермы, мкм	$97,4 \pm 4,6$	$125,9 \pm 5,3$ $p_{1-2} < 0,001$	$93,1 \pm 6,1$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,001$
Эпидермис/дерма, отн.ед.	$0,25 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,03$ $p_{1-2} < 0,001$	$0,27 \pm 0,02$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} < 0,001$

Пр и м е ч а н и я : p_{1-2} – уровень достоверности различий показателей группы сравнения по отношению к контрольной группе; p_{2-3} – уровень достоверности различий показателей опытной группы по отношению к группе сравнения; p_{1-3} – уровень достоверности различий показателей опытной группы по отношению к контрольной группе.

К 21-м суткам с момента формирования раны морфометрическое изучение гистологических показателей кожи свидетельствует о том, что в опытной группе толщина эпидермиса и дермы, а также их соотношение приближались к показателям контрольной группы, тогда как в группе сравнения эти показатели были достоверно выше ($p < 0,001$). В опытной группе раневой дефект был покрыт тонким и дифференцированным эпителием.

Заключение

Изучено и подтверждено стимулирующее влияние на регенерацию экспериментальной условно-асептической раны наночастиц меди с учетом комплекса показателей (планиметрических, гематологических, морфометрических, бактериологических). Под влиянием наночастиц меди отмечены изменения планиметрических исследований у животных опытной группы (уменьшение площади раны, увеличение скорости заживления ран), нормализация гематологических показателей. Морфометрическое изучение характеристик раневой поверхности также подтверждает оптимизацию репаративных процессов в экспериментальной ране. В работе показано выраженное профилактическое действие наночастиц меди в отношении вторичного инфицирования раны, что подтверждается данными бактериологических исследований.

Список литературы

1. Арсентьева И.П. Аттестация и применение наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов / И.П. Арсентьева, Е.С. Зотова, Г.Э. Фолманис [и др.] // Нанотехника. Спец. выпуск «Нанотехнологии – медицине». – 2007. – № 2 (10). – С. 72–77.
2. Глушенко Н.Н. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов // Н.Н. Глушенко, О.А. Богословская, И.П. Ольховская // Химическая физика. – 2002. – Т. 21(4). – С. 79–85.
3. Инфекции в хирургии / В. Гостищев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 768 с.
4. Рахметова А.А. Ранозаживляющие свойства наночастиц меди в зависимости от их физико-химических характеристик / А.А. Рахметова, Т.П. Алексеева, О.А. Богословская [и др.] // Российские нанотехнологии. – 2009. – № 3–4. – С. 102–108.
5. Рахметова А.А. Изучение биологической активности наночастиц меди, различающихся по дисперсности и фазовому составу: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2011. – 24 с.

6. Теория и практика местного лечения гнойных ран. (Проблемы лекарственной терапии) / под ред. Б.М. Даценко. – Киев: «Здоров'я», 1995. – 383 с.

7. Huang S.S. and Platt R. Risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after previous infection or colonization // Clin.Infect.Dis. – 2003. – Vol. 36. – P. 281–285.

8. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles / J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji // Acta Biomaterialia. – 2008. – Vol. 4. – P. 707–716.

9. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization / E. Weir, A. Lawlor, A. Whelan, F. Regan // Analyst. – 2008. – Vol. 133, № 7. – P. 835–845.

References

1. Arsent'eva I.P. Attestatsiya i primeneniye nanochastich metallov v kachestve biologicheskii aktivnykh preparatov / I.P. Arsent'eva, E.S. Zotova, G.E. Folmanis [i dr.] // Nanotekhnika. Spets. vypusk «Nanotekhnologii-medicine». 2007. no. 2 (10). pp. 72–77.

2. Gluschenko N.N. Fiziko-khimicheskie zakonomernosti biologicheskogo dejstviya vysokodispersnykh poroshkov metall-ov // N.N. Gluschenko, O.A. Bogoslovskaya, I.P. Ol'hovskaya // Himicheskaya fizika. 2002. T. 21(4). pp. 79–85.

3. Infektsii v hirurгии // V. Gostishchev. GE'OTAR-Media. 2007. 768 p.

4. Rakhmetova A.A. Ranozazhivlyayushchie svoystva nanochastich medi v zavisimosti ot ih fiziko-himicheskikh harakteristik / A.A. Rakhmetova, T.P. Alekseeva, O.A. Bogoslovskaya [i dr.] // Rossiiskie nanotekhnologii. 2009. no. 3–4. pp. 102–108.

5. Rakhmetova A.A. Izuchenie biologicheskoi aktivnosti nanochastich medi, razlichayushchihsiya po dispersnosti i fazovomu sostavu: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. M., 2011. 24 p.

6. Teoriya i praktika mestnogo lecheniya gnojnykh ran. (Problemy lekarstvennoj terapii) / Pod red. B.M. Dacenko. Kii: «Zdorov'ya», 1995. 383 p.

7. Huang S.S. and Platt R. Risk of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after previous infection or colonization // Clin.Infect.Dis. 2003. Vol. 36. pp. 281–285.

8. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles / J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttagupta, S. Mukherji // Acta Biomaterialia. 2008. Vol. 4. pp. 707–716.

9. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization / E. Weir, A. Lawlor, A. Whelan, F. Regan // Analyst. 2008. Vol. 133, no. 7. pp. 835–845.

Рецензенты:

Гладилин Г.П., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики, ФПК и ППС, ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов;

Волков А.А., д.в.н., профессор, заведующий кафедрой «Терапия, акушерство и фармакология», ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 30.04.2014.