

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ НА КЛИНИЧЕСКУЮ КАРТИНУ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ У КРЫС

СИМОНОВ П.В.*, РЕЗНИЧЕНКО Л.С.***, ЧЕКМАН И.С.*

*Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, Украина

**Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины, Украина

Резюме.

Цель работы – определение влияния пятикратного внутривенного введения наночастиц меди на клиническую картину и морфологические показатели крови при экспериментальной генерализованной инфекции у крыс.

Материал и методы. У крыс линии Wistar моделировали генерализованную инфекцию путем внутривенного введения смеси суспензий суточных культур трех микроорганизмов – *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus zooepidemicus*. Лечение проводили введением в латеральную хвостовую вену субстанции наночастиц нуль-валентной меди размером 20 нм (в дозах 4 мг/кг или 40 мг/кг) или лекарственного средства сравнения цефтриаксона (в дозе 60 мг/кг) через 24 часа после заражения и по 1 разу в день в течение следующих 4 суток. Эффективность применения субстанции наночастиц меди определяли по таким параметрам, как клиническая картина, масса тела и морфологические показатели крови. Результаты. Применение субстанции наночастиц меди обеспечило улучшение клинического течения генерализованной инфекции и не привело к существенному уменьшению массы тела животных. Результаты определения морфологических показателей крови подтвердили положительную динамику выздоровления. В условиях примененной модели цефтриаксон оказался менее эффективным, чем субстанция наночастиц меди.

Заключение. Наночастицы меди более эффективны по сравнению с цефтриаксоном при лечении генерализованной инфекции у крыс, исходя из значений таких параметров, как клиническая картина, масса тела и морфологические показатели крови.

Ключевые слова (*MeSH Terms*): доклиническое исследование, наночастицы металлов, медь, бактериемия, анализ крови, признаки и симптомы.

Abstract.

Objectives. To determine the influence of fivefold intravenous administration of copper nanoparticles on clinical picture and morphologic blood indices in experimental generalized infection in rats.

Material and methods. Generalized infection was modelled in Wistar rats by means of intravenous injection of mixed suspensions of day's bacterial cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus zooepidemicus*. Rats were treated with intravenous injections of 20 nm metallic copper nanoparticles (4 mg/kg or 40 mg/kg) as a drug under study or ceftriaxone (60 mg/kg) as a comparator in 24 hours after infection and once a day during four subsequent days. The efficacy of copper nanoparticles use was determined according to such parameters as clinical picture, body weight, and morphologic blood indices.

Results. Copper nanoparticles administration resulted in the improvement of clinical course of generalized infection and didn't lead to any significant decrease in body weight of animals. The determined morphologic blood indices confirmed positive dynamics of their recovery. Ceftriaxone proved to be less effective than copper nanoparticles in the infection model used.

Conclusions. Copper nanoparticles possess greater efficacy compared to ceftriaxone in the treatment of generalized infection in rats judging by such parameters as clinical picture, body weight, and morphologic blood indices.

Key words: *preclinical study, metal nanoparticles, copper, bacteriemia, blood count, signs and symptoms.*

На сегодняшний день, несмотря на определенные успехи в диагностике и лечении, терапия генерализованных инфекций и, в частности, сепсиса остается одной из нерешенных проблем здравоохранения. По данным украинских ученых, летальность при сепсисе составляет 17–40%, в отдельных случаях – 72–87%, а иногда достигает 100% [1]. Согласно обобщенным Paul M. et al. (2010) данным по США и Испании, сепсис развивается у 1,1–2,4 из 1000 человек в год, и от 20% до 42% таких пациентов впоследствии умирают от данной патологии [2].

Сложившуюся ситуацию усугубляет развитие резистентности патогенных бактерий и грибов к антибиотикам [3]. Так, в 2011 году в трети стран Европы отмечено стремительное возрастание количества штаммов микроорганизмов, резистентных одновременно к цефалоспорином III поколения, фторхинолонам и аминогликозидам [4].

Один из возможных путей решения проблемы – разработка противомикробных лекарственных средств принципиально нового класса, активных по отношению к широкому спектру микроорганизмов, в том числе, резистентных к современным антибиотикам. В роли таких субстанций могут выступить наночастицы металлов [5, 6, 7]. Так, синтезированные в Институте биокolloидной химии имени Ф.Д. Овчаренко НАН Украины по оригинальному протоколу методом химической конденсации в водном растворе наночастицы меди (НЧМ) размером 20 нм и 40 нм, согласно результатам совместных исследований с кафедрой фармакологии Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца и Института урологии НАН Украины, проявили выраженную противомикробную активность *in vitro* относительно как эталонных тест-штаммов, так и клинических изолятов микроорганизмов, выделенных у пациентов хирургического профиля [8, неопубликованные данные].

В плане продолжения исследований целесообразным представляется определение эффективности применения НЧМ *in vivo* при лечении генерализованной инфекции у крыс.

Цель исследования – определить влияние НЧМ при пятикратном внутривенном введении на клиническую картину и морфологические показатели крови при экспериментальной генерализованной инфекции у крыс.

Материал и методы

Стабильные сферические наночастицы нуль-валентной меди размером 20 нм синтезированы в Институте биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины по оригинальному протоколу методом химической конденсации в водном растворе. К субстанции предоставлен паспорт безопасности наноматериала, согласно которому НЧМ являются безопасными по параметрам генотоксичности, мутагенности и цитотоксичности *in vitro* и по биохимическим маркерам, таким как аденозинтрифосфатазная и лактатдегидрогеназная активность [9].

В качестве лекарственного средства сравнения применяли антибиотик группы цефалоспоринов III поколения цефтриаксон. Применение данного лекарственного средства рекомендовано для терапии внебольничного сепсиса с неустановленным первичным очагом, с локализацией первичного очага в почках и ЦНС, в том числе при открытых травмах черепа и позвоночника, для терапии сепсиса после спленэктомии, для лечения внутрибольничного сепсиса с локализацией первичного очага в легких («ранняя» нозокомиальная пневмония), в сочетании с метронидазолом для терапии внебольничного сепсиса с локализацией первичного очага в органах брюшной полости, а также в качестве альтернативного средства в сочетании с клиндамицином или метронидазолом для лечения сепсиса с локализацией первичного очага в коже, мягких тканях и костях [10, 11].

Исследования проведены на 18 самцах лабораторных крыс линии Wistar массой 180–220 г (далее – крысы) с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы от 18.03.1986 г. об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях, Директивы Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, Приказа Министерства здравоохранения Украины № 944 от 14.12.2009 г. «Об утверждении Порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств», Закона Украины № 3447-IV от 21.02.2006 г. «О защите животных от жестокого обращения».

Животные, взятые в эксперимент, содержались в стандартных условиях вивария Института ветеринарной медицины НААН Украины при температуре воздуха 22–24°C и относительной влажности 50–70% со свободным доступом к корму и воде. Период карантина и акклиматизации длился 7 дней. План эксперимента одобрен Комитетом по биоэтике Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца, все связанные с гуманным обращением с животными процедуры соблюдены.

Животные методом рандомизации были разделены на 6 групп по следующей схеме:

- группа 1 – контрольные условно-здоровые интактные животные;
- группа 2 – контрольные условно-здоровые животные, которым внутривенно вводили 0,5 мл физиологического раствора натрия хлорида (контроль на стресс-фактор) 1 раз в сутки на протяжении 5 суток;
- группа 3 – животные с нелеченой генерализованной инфекцией;
- группа 4 – животные с генерализованной инфекцией, которым внутривенно вводили субстанцию НЧМ в дозе 4 мг/кг в пересчете на металл;
- группа 5 – животные с генерализованной инфекцией, которым внутривенно вводили субстанцию НЧМ в дозе 40 мг/кг в пересчете на металл;
- группа 6 – животные с генерализованной инфекцией, которым внутривенно вводили лекарственное средство сравнения цефтриаксон в дозе 60 мг/кг.

Моделирование генерализованной инфекции проводили путем введения в латеральную хвостовую вену крыс групп №№ 3–6 0,5 мл смеси суспензий суточных культур трех микроорганизмов – *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus zooepidemicus* – в соотношении 1: 1: 1 ($2,0 \times 10^8$ КОЕ каждого микроорганизма в 1 мл суспензии). Концентрации микроорганизмов в суспензии определяли по стандарту МакФарланда.

Экспериментальное лечение – путем введения в латеральную хвостовую вену субстанции НЧМ или лекарственного средства сравнения цефтриаксона – начинали через 24 часа после заражения и проводили по 1 разу в день в течение следующих 4 суток.

Субстанцию НЧМ вводили в дозах 4 мг/кг (группа 4) и 40 мг/кг (группа 5) в пересчете на металл, составлявших, соответственно, 1/80 и 1/8 от значения показателя LD_{50} (320 мг/кг), установленного при токсикологических исследованиях с учетом экстраполяции результатов с мышей на крыс с применением коэффициента видовой устойчивости [12, неопубликованные данные].

Выбранная доза цефтриаксона 60 мг/кг соответствовала терапевтической дозе с учетом экстраполяции с человека на крыс с применением коэффициента видовой устойчивости [12].

Первые 18 часов после инфицирования и дважды в сутки в течение эксперимента (6 суток) наблюдали за клиническими проявлениями инфекции. Для регистрации динамики изменения массы тела животных последних взвешивали непосредственно перед заражением, на первый, третий и пятый день лечения и перед выводом из эксперимента.

Эффективность применения субстанции НЧМ при лечении генерализованной инфекции крыс, по сравнению с эффективностью цефтриаксона, также исследовали по изменениям ряда маркерных гематологических показателей: количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобин, гематокрит и процентное соотношение лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов и базофилов в лейкоцитарной формуле. У животных всех групп отбирали кровь в контейнеры с консервантом (ЭДТА) для дальнейших исследований. Отбор крови осуществляли путем декапитации под хлороформным наркозом. Определение показателей осуществляли с применением гематологического анализатора Mythic 22 компании PZ CORMAY S.A.

Статистическую обработку данных проводили с применением программ BioStat 2009 for Windows (v5.8.4.3) компании AnalystSoft Inc. и Microsoft Office Excel 2007 компании Microsoft. Результаты отдельных измерений представлены в виде средних значений со стандартными ошибками. Дисперсии независимых выборок сравнивали с помощью двухвыборочного F-теста и в зависимости от полученного значения F-критерия применяли двухвыборочный t-тест с одинаковыми или разными дисперсиями. Для сравнения зависимых выборок применяли парный двухвыборочный

t-тест для средних. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На протяжении первых часов после инфицирования у всех животных отмечали угнетение двигательной активности, пилоэрекцию и тремор, что свидетельствовало о развитии лихорадки; животные отказывались от корма и воды, наблюдалась гипервентиляция.

В группах животных, которым вводили субстанцию НЧМ, отмечали улучшение клинической картины, начиная со второго дня лечения: исчезла пилоэрекция, восстановилась двигательная активность, появился аппетит.

У крыс, которым вводили цефтриаксон, не наблюдали признаков выздоровления. В последний день лечения состояние этих животных ухудшилось, они практически не передвигались в клетке, сбивались в углу; периодически отмечался тремор.

В контрольных группах №№ 1–2 отклонений во внешнем состоянии и поведении животных не отмечалось.

Нелеченные животные группы № 3 на вторые сутки эксперимента погибли.

Результаты наблюдений за изменениями массы тела животных приведены в таблице 1.

В группе интактных животных отмечали статистически значимое увеличение массы тела на протяжении эксперимента. На шестой день прирост массы в этой группе составил 7,33% по сравнению с исходными данными.

В группе животных, которым вводили физиологический раствор, масса тела не претерпела существенных изменений.

В опытных группах животных, которым

вводили субстанцию НЧМ, отмечали дозозависимые закономерности в изменении массы тела. Так, в группе крыс, которым вводили НЧМ в меньшей дозе (группа №4), наблюдалась тенденция к уменьшению массы тела на 4,33% по сравнению с исходными данными, однако различия не были статистически значимыми. Снижение массы тела животных на протяжении исследования наблюдали и в группе № 5, где в последний день эксперимента отмечали статистически значимое уменьшение данного показателя на 8,96% по сравнению с исходными данными.

В группе №6 (введение цефтриаксона) наблюдали более выраженное статистически значимое уменьшение массы тела животных, начиная с третьих суток наблюдения. Так, средняя масса животных была на 10,25% меньше исходных данных на третьи сутки лечения и на 10,72% – в последний день эксперимента.

Таким образом, применение субстанции НЧМ обеспечило улучшение клинических проявлений инфекции и не привело к существенному уменьшению массы тела животных, в то время как цефтриаксон оказался менее эффективным.

Результаты гематологических исследований отражены в таблице 2.

В группе животных, которым вводили физиологический раствор, морфологические показатели крови существенно не отличались от таковых в группе интактных животных.

Введение субстанции НЧМ в дозах 4 мг/кг и 40 мг/кг на фоне генерализованной инфекции не оказывало отрицательного влияния на красные кровяные тельца, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий в показателях количества эритроци-

Таблица 1 – Изменение массы тела животных при лечении генерализованной инфекции крыс

Группа	Масса тела животных, г				
	Исходные данные	1 сутки	3 сутки	5 сутки	6 сутки
№1	204,50±2,50	217,00±2,00*	214,00±2,00*	208,00±3,00	219,50±0,50*
№2	208,00±1,00	213,00±2,00*	210,50±1,50	207,50±13,50	215,00±6,00
№3	213,33±4,81	207,00±7,51	–	–	–
№4	215,33±4,67	219,67±4,37	210,00±4,04	206,33±10,20	206,00±10,69
№5	209,25±4,53	212,25±5,56	201,00±6,01	194,25±7,35*	190,50±7,29*
№6	211,33±0,67	206,33±4,41	189,67±8,41*	195,33±13,28*	188,67±17,40*

Примечания: $M \pm m$ – среднее значение $\pm$ стандартная ошибка; * – статистически значимое различие по сравнению с исходным значением, $p < 0,05$.

Таблица 2 – Изменение морфологических показателей крови при лечении генерализованной инфекции крыс

Морфологические показатели	Группы животных					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
Лейкоциты, $10^3/\text{мкл}$	10,03±1,05	11,43±1,62	7,03±0,81*	9,77±1,47	12,90±1,95	15,90±2,12*
Лимфоциты, %	73,90±6,20	68,87±4,48	56,57±3,45*	65,80±3,58	66,60±3,60	56,10±4,00*
Моноциты, %	3,87±0,58	5,30±0,90	9,70±0,95*	6,50±0,85*	6,95±0,70*	8,70±0,80*
Нейтрофилы, %	16,10±1,55	16,30±1,93	21,80±2,10*	20,10±3,40	18,10±2,70	29,10±3,12*
Эозинофилы, %	0,97±0,15	2,87±0,38*	1,97±0,22*	0,70±0,12	1,28±0,19	0,70±0,11
Базофилы, %	5,27±0,79	6,67±0,97	9,93±0,79*	7,00±1,05	7,20±1,16	5,50±0,83
Эритроциты, $10^6/\text{мкл}$	7,61±1,14	8,08±0,44	7,91±0,16	7,76±0,36	6,09±0,94	7,70±0,62
Гемоглобин, г/дл	13,37±1,65	13,70±0,68	13,57±0,19	13,63±0,54	10,53±1,56	13,50±1,03
Гематокрит, %	38,40±4,60	39,87±1,84	40,30±0,95	38,30±1,60	30,70±3,90	38,60±2,98
Тромбоциты, $10^3/\text{мкл}$	589±88	584±60	739±74	737±92	789±122	821±90*

Примечания: $M \pm m$ – среднее значение $\pm$ стандартная ошибка; * – статистически значимое различие по сравнению с интактным контролем (группой № 1), $p < 0,05$.

тов, концентрации гемоглобина и уровня гематокрита, по сравнению с соответствующими показателями крови животных контрольной группы №1. Также у животных опытных групп №№ 4, 5 не наблюдалось статистически значимых изменений количества тромбоцитов.

Поскольку септические поражения часто сопровождаются анемией, разрушением эритроцитов, выходом свободного гемоглобина в плазму крови и повышением количества тромбоцитов в крови [13, 14, 15], приведенные выше данные указывают на проявление положительного терапевтического эффекта применения субстанции НЧМ.

Важным свидетельством наличия лечебного эффекта является улучшение большинства лейкоцитарных показателей у животных всех групп введения субстанции НЧМ: снижение общего количества лейкоцитов, уменьшение процентного содержания нейтрофилов, а также увеличение процентного содержания лимфоцитов до уровня этих показателей у животных контрольной группы № 1. Процентное содержание моноцитов в группах №№ 4, 5 было повышено по сравнению с контролем (группа №1), но в группе применения лекарственного средства сравнения цефтриаксона данный показатель был статистически значимо выше, чем в группах введения субстанции НЧМ.

Такие данные подтверждают положительную динамику выздоровления, поскольку известно, что септические поражения часто со-

провожаются лейкоцитозом, нейтрофилией, лимфопенией и моноцитозом [13, 14, 16].

Таким образом, применение нового противомикробного средства в условиях генерализованной инфекции не только не привело к угнетению кроветворения подопытных животных, но и позволило улучшить клиническое течение инфекции и достичь признаков выздоровления.

В то же время, при лечении цефтриаксоном выявлено статистически значимое существенное увеличение количества тромбоцитов по сравнению с данным показателем в контрольных группах животных №№ 1, 2 (на 39,39% и 40,58%, соответственно), и отклонения в лейкоцитарных показателях крови животных: лейкоцитоз, нейтрофилия, лимфопения и моноцитоз. Вышеперечисленные изменения, вместе с ухудшением клинических проявлений инфекции, свидетельствуют о том, что в условиях примененной модели генерализованной инфекции данный антибиотик оказался менее эффективным, чем субстанция НЧМ.

Заключение

1. Стабильные сферические наночастицы нуль-валентной меди размером 20 нм, синтезированные по оригинальному протоколу методом химической конденсации в водном растворе, при пятикратном внутривенном введении крысам в дозах 4 мг/кг и 40 мг/кг, улуч-

шали клиническое течение генерализованной инфекции.

2. Применение наночастиц меди при лечении генерализованной инфекции не приводило к угнетению кроветворения подопытных животных и нормализовало морфологические показатели крови.

3. Наночастицы меди проявили большую эффективность по сравнению с цефтриаксоном при лечении генерализованной инфекции у крыс, исходя из значений таких параметров, как клиническая картина, масса тела и морфологические показатели крови.

Литература

1. Шаповал, С. Д. Основы формування лікувальної програми у хворих на сепсис / С. Д. Шаповал, І. Л. Савон, Б. М. Даценко // Шпитальна хірургія. – 2013. – № 2. – С. 9–13.
2. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis / M. Paul [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010 Nov. – Vol. 54, N 11. – P. 4851–4863.
3. Gootz, T. D. The global problem of antibiotic resistance / T. D. Gootz // Crit. Rev. Immunol. – 2010. – Vol. 30, N 1. – P. 79–93.
4. Llor, C. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem / C. Llor, L. Bjerrum // Ther. Adv. Drug Saf. – 2014 Dec. – Vol. 5, N 6. – P. 229–241.
5. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І. С. Чекман [та ін.]. – Київ : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
6. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents / A. M. Allahverdiyev [et al.] // Expert Rev. Anti. Infect. Ther. – 2011 Nov. – Vol. 9, N 11. – P. 1035–1052.
7. Pelgrift, R. Y. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance / R. Y. Pelgrift, A. J. Friedman // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2013 Nov. – Vol. 65, N 13/14. – P. 1803–1815.
8. Ефективність дії наночастинок міді до збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації / Л. С. Резніченко [та ін.] // Вісник фармації. – 2012. – № 3. – С. 75–78.
9. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів : методичні рекомендації / І. М. Трахтенберг [та ін.]. – Київ : 2013. – 108 с.
10. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 19 березня 2007 року № 128 «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Пульмонологія» [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20070319_128.html. – Дата доступу: 20.07.2015.
11. Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патологоанатомическая диагностика : руководство / под ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда. – Москва : Литтерра, 2006. – 176 с.
12. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / під ред. О. В. Стефанова. – Київ : Авіцена, 2001. – 528 с.
13. Aird, W. C. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis / W. C. Aird // Mayo Clin. Proc. – 2003 Jul. – Vol. 78, N 7. – P. 869–881.
14. Goyette, R. E. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications / R. E. Goyette, N. S. Key, E. W. Ely // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2004 Dec. – Vol. 25, N 6. – P. 645–659.
15. Diagnostic and prognostic value of thrombocytosis in admitted medical patients / J. Z. Tchabiner [et al.] // Am. J. Med. Sci. – 2011 Nov. – Vol. 342, N 5. – P. 395–401.
16. Cavaillon, J. M. Immune status in sepsis: the bug, the site of infection and the severity can make the difference / J. M. Cavaillon, M. Adib-Conquy // Crit. Care. – 2010. – Vol. 14, N 3. – P. 167.

Поступила 29.06.2015 г.

Принята в печать 07.08.2015 г.

Сведения об авторах:

Симонов П.В. – аспирант кафедры фармакологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца, Украина;

Резниченко Л.С. – к.б.н., старший научный сотрудник отдела коллоидной технологии природных систем Института биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины, Украина;

Чекман И.С. – член-кор. НАН и НАМН Украины, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца, Украина.

Адрес для корреспонденции: Украина, 03057, г. Киев, пр. Победы, 34, Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, кафедра фармакологии. E-mail: simonovpavlo@ukr.net – Симонов Павел Вадимович.