

Yu.V. Mandra - Doctor of Science (Medicine), Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

maximkopenkin@yandex.ru

УДК 579.61

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Марина Валерьевна Кырф¹, Вячеслав Олегович Пономарев², Софья Марковна Розанова¹

¹ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр»

²АО Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. В данной статье представлено экспериментальное исследование о перспективах и возможностях применения квантовых точек и созданных на их основе биоконъюгатов в лечении воспалительных заболеваний глаза. **Цель работы** – анализ противомикробной активности в условиях бактериологической лаборатории. **Материал и методы.** В качестве квантовых точек (КТ) были взяты два вида искусственных флуорофоров, способных к генерации супероксидных радикалов, синтезированных по специальному техническому заданию в ФГУП «НИИ прикладной акустики» (г. Дубна Московской области): тип 1 - коллоидный раствор КТ CdTe/Cd МРА 710 10% масс; 2-й тип - коллоидный раствор КТ InP/ZnSe/ZnS 650 10% масс. В исследование были включены «музейные» и внутрибольничные штаммы микроорганизмов, а активность точек оценивали с помощью диско-диффузионного метода с последующим анализом зон задержки роста бактерий. Тестировались концентрации 0,1, 0,01 и 0,001% квантовых точек, а также растворы биоконъюгатов (антибиотик + квантовые точки) Ванкомицина, Левофлоксацина, Цефтазидима и Цефотаксима. **Результаты.** На основании полученных данных сделаны выводы, что квантовые точки способны сдерживать рост патогенных штаммов микроорганизмов, усиливая действие антибиотиков в отношении отдельных штаммов микроорганизмов как амбулаторных, так и госпитальных. **Выводы.** Источник возбуждения и концентрация КТ не оказывают существенного влияния на чувствительность микроорганизмов при данном дизайне эксперимента. Результаты свидетельствуют об антибактериальном эффекте КТ CdTe/Cd и InP/ZnSe/ZnS и их комбинации с антибиотиками на амбулаторные и госпитальные штаммы бактерий.

Ключевые слова: квантовые точки, биоконъюгаты, эндофтальмит, бактериология.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF QUANTUM DOTS: AN EXPERIMENTAL STUDY

Marina V. Kirf¹, Vyacheslav O. Ponomarev², Sofya M. Rozanova¹

¹Clinical and Diagnostic Center of Yekaterinburg

²Yekaterinburg Center of Intersectoral Scientific and Technical Complex «Eye Microsurgery»

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. This article presents the part of an experimental study on the prospects and possibilities of using quantum dots and bioconjugates created on their basis in the treatment of inflammatory diseases of the eye. **The purpose of the study** is to analyze their antimicrobial activity in a bacteriological laboratory. **Material and methods.** As QDs, we took two types of artificial fluorophores capable of generating superoxide radicals synthesized according to a special technical assignment at the Federal State Unitary Enterprise “Research Institute of Applied Acoustics”, Dubna, Moscow Region: type 1 - colloidal solution of QD CdTe / Cd MPA 710 10% of the mass. Type 2 - colloidal solution of QD InP / ZnSe / ZnS 650 10% wt. The study included “museum” and nosocomial strains of microorganisms, and the activity of points was assessed using the disk diffusion method, followed by an assessment of the zones of inhibition of bacterial growth. Concentrations of 0.1%, 0.01%, and 0.001% quantum dots were tested, as well as solutions of bioconjugates (antibiotic + quantum dots) of Vancomycin, Levofloxacin, Ceftazidime and Cefotaxime. **Results.** Based on the data obtained, it was concluded that quantum dots potentiate the action of the sensitivity of individual microorganisms, both outpatient and hospital strains. **Conclusions.** The source of excitation and the concentration of CT do not affect the sensitivity of microorganisms. The results indicate the antibacterial effect of CT CdTe/Cd and InP/ZnSe/ZnS and their combination with antibiotics on outpatient and hospital bacterial strains.

Keywords: Quantum dots, bioconjugates, endophthalmitis, bacteriology.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время остро стоит вопрос лечения глазных инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной устойчивостью. Одним из вариантов решения является возможность применения флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, так называемых квантовых точек (КТ, англ. quantum dot). Использование свойства КТ переходить в возбужденное состояние под действием видимого света и активировать кислород, превращая его в супероксидный радикал, делает возможным применение КТ в офтальмологической практике.

КТ представляют собой полиморфные многослойные (2 слоя и более) наноразмерные кристаллы сферической, эллиптической и другой формы с чрезвычайно многогранными оптическими и физико-химическими свойствами [1]. Полупроводниковые КТ обычно синтезируют из элементов групп II–VI или III–V Периодической таблицы, например CdSe, CdTe, InAs. Для повышения активности КТ обычно применяют структуру типа ядро/оболочка. Оболочку выполняют из другого полупроводника, например CdS, ZnS. Введение оболочки (силанизация) значительно увеличивает активность КТ и их химическую устойчивость, обеспечивая возможность функционализации

поверхности для обеспечения коллоидной стабильности и биосовместимости, а также снижает их токсичность. Функционализация КТ определяется их биосовместимостью и проводится тиолированными молекулами полиэтиленгликоля, полиэтиленамином, олигонуклеотидами, иммуноглобулинами, пептидами, полисахаридами, липидами и многими другими (Рис. 1).

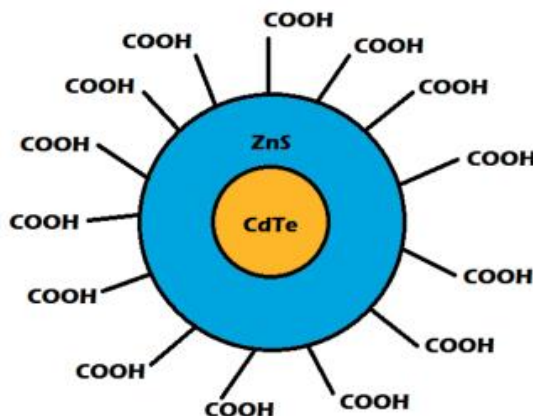


Рис. 1 Пример двухоболочечной КТ CdTe/ZnS, функционализированной карбоксильной группой

Размеры КТ варьируют от единиц до 100 нм, при этом значительная доля атомов (около 1%) находится на поверхности КТ, вследствие этого под действием источников возбуждения (освещения) различной длины волны они обладают повышенной реакционной способностью, присоединяя или экспортируя атомы окружения [2]. Как правило, КТ поставляются в виде коллоидных растворов для их последующего использования (Рис. 2).

Цель исследования – лабораторный анализ антимикробной активности квантовых точек и биоконъюгатов на их основе в отношении актуальных возбудителей инфекционных офтальмологических заболеваний.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Микробиологическое исследование проводили на базе ГАУЗ СО «Клинико-диагностический центр (город Екатеринбург)». При разработке методики использовали рутинный метод определения чувствительности – диско-диффузионный, с модификацией для решения задач эксперимента.

Материалом для работы служили по одному амбулаторному и госпитальному (высокорезистентному) штамму *St.aureus*, *St.epidermidis*, *E.faecalis*, *E. coli*, *Kl.pneumoniae*, *Ps.aeruginosa*.

Выбор препаратов для тестирования соответствовал формуляру, применяемому в офтальмологии: для грамположительной флоры – ванкомицин (30 мг), левофлоксацин (5 мг), грамотрицательной – цефтазидим (10мг), цефотаксим (5 мг).

На поверхность агара Мюллер-Хинтона (BD, США) наносили с помощью аппликатора бактериальную суспензию (концентрация бактериальных клеток 0,5 McF). После высыхания бактериального газона для проверки антибактериальной активности вносили 10 мкл КТ. Для определения возможности использования биоконъюгатов на основе КТ и антибиотиков на

бактериальный газон помещали диски с антибиотиками (BioRad, France), на которые наносили по 6 мкл КТ. В качестве контроля использовали диск с антибиотиком, без нанесенного раствора.

Для проведения исследования использованы два вида 10% коллоидных растворов квантовых точек: CdTe/Cd МРА 710. и InP/ZnSe/ZnS 650 (ФГУП «НИИ прикладной акустики», Россия). Использовали концентрированный препарат и разведения 1:10, 1:100, 1:1000.

Учитывая обязательный факт воздействия света для активации КТ, инкубацию посевов проводили в термостате (35 С) в темноте и на свету. В качестве источника фотовозбуждения КТ (спектр излучения источника соответствовал спектру поглощения КТ) использовали светодиодную ленту, подключенную к аккумулятору бесперебойного питания и помещаемую в термостат.

Антибактериальную активность дисков с антибиотиками оценивали по размерам зоны задержки роста (ЗЗР) в соответствии с Клиническими рекомендациями [3]. Для анализа эффективности воздействия КТ (биоконоъюгат КТ/АБ) рассматривали увеличение ЗЗР по сравнению с исходным на 2 мм (умеренное увеличение эффективности) и более 2 мм (высокое). (Рис. 2).

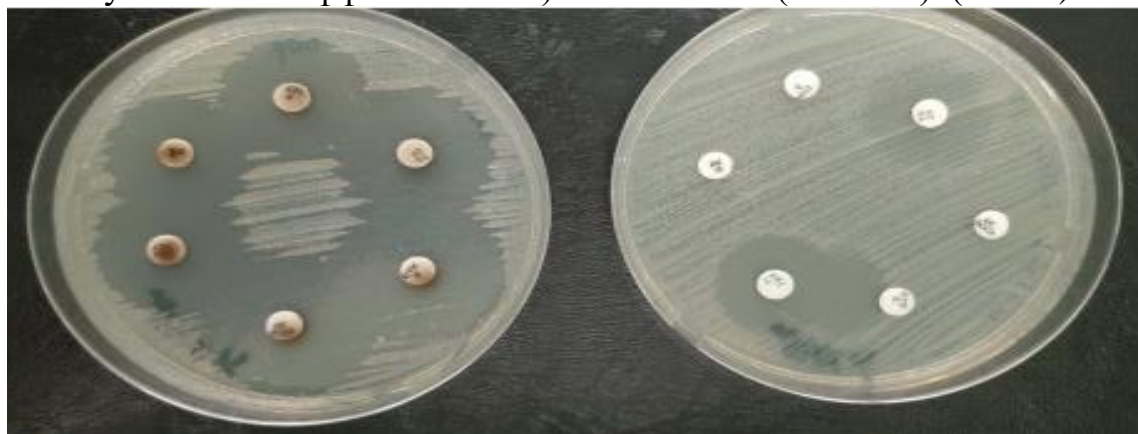


Рис. 2. Пример формирования ЗЗР с дисками без нанесения КТ (справа) и нанесенными КТ CdTe/Cd МРА 710 (слева)

Таблица 1.

Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов (мм)

Амбулаторные штаммы														
Микроорганизм	С источником возбуждения							Без источника возбуждения						
	б/р	CdTe/Cd			InP/ZnSe/ZnS			б/р	CdTe/Cd			InP/ZnSe/ZnS		
		1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10		1:1	1:10	1:10	1:1	1:10	1:10
<i>St.aureus</i> Ванкомицин	17	17	17	17	17	17	17	17	18	18	18	17	17	17
<i>St.aureus</i> Левифлоксацин	26	29	29	29	29	29	29	28	29	29	29	29	29	29
<i>St.epidermidis</i> Левифлоксацин	30	30	30	30	29	29	29	30	31	31	31	30	30	30
<i>St.epidermidis</i> Ванкомицин	18	19	19	19	18	18	18	20	21	21	21	20	20	20

<i>E.faecalis</i> Ванкомицин	17	18	18	18	17	17	17	17	18	18	18	17	17	17
<i>E.faecalis</i> Левифлоксацин	22	23	22	22	22	22	22	22	24	22	21	22	22	22
<i>E.coli</i> Цефотаксим	27	32	29	27	30	28	27	27	31	29	27	30	29	27
<i>E.coli</i> Цефтазидим	24	30	28	25	26	24	23	26	30	28	26	26	26	26
<i>Kl.pneumoniae</i> Цефотаксим	33	36	34	33	35	33	32	35	35	35	35	35	35	35
<i>Kl.pneumoniae</i> Цефтазидим	30	31	32	30	33	32	32	30	33	31	30	31	31	31
<i>Ps.aeruginosa</i> Цефотаксим	16	29	24	19	29	28	27	16	25	21	16	30	29	28
<i>Ps.aeruginosa</i> цефтазидим	25	25	25	25	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
Госпитальные штаммы														
Микроорганизм	С источником возбуждения							Без источника возбуждения						
		CdTe/Cd			InP/ZnSe/ZnS				CdTe/Cd			InP/ZnSe/ZnS		
	б/р	1:10	1:10 0	1:10 00	1:10	1:10 0	1:10 00	б/р	1:1 0	1:10 0	1:10 00	1:1 0	1:10 0	1:10 00
<i>St.aureus</i> Ванкомицин	20	20	20	20	20	20	20	20	22	22	22	20	20	20
<i>St.aureus</i> Левифлоксацин	28	32	30	30	30	30	30	28	32	32	32	32	32	32
<i>St.epidermidis</i> Ванкомицин	19	19	19	19	18	18	18	20	21	21	20	20	20	20
<i>St.epidermidis</i> Левифлоксацин	30	30	30	30	30	29	29	30	31	31	30	30	30	30
<i>E.faecalis</i> Ванкомицин	16	16	16	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
<i>E.faecalis</i> Левифлоксацин	16	19	19	19	19	19	19	20	20	20	20	20	20	20
<i>E.coli</i> Цефотаксим	26	33	29	26	31	28	26	28	31	30	28	30	29	28
<i>E.coli</i> Цефтазидим	24	28	28	25	25	25	25	24	29	28	26	27	26	26
<i>Kl.pneumoniae</i> Цефотаксим	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>Kl.pneumoniae</i> Цефтазидим	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>Ps.aeruginosa</i> Цефотаксим	6	23	19	11	23	20	10	6	21	18	9	20	17	8
<i>Ps.aeruginosa</i> Цефтазидим	20	23	22	20	23	23	20	20	23	22	20	21	21	21

*Примечание: б/р – диск с антибиотиком, КТ не нанесены

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы продемонстрирована активность прямого воздействия КТ CdTe/Cd и InP/ZnSe/ZnS на бактерий – зоны лизиса определены при действии на все испытанные культуры. Результаты эффективности биоконъюгатов представлены в таблице 1. Большинство исследуемых штаммов чувствительны к тестируемым препаратам (ЗЗР более 22 мм в столбце б/р).

Интересно отметить, что прямой корреляции между ЗЗР и использованной концентрацией КТ не выявлено. Также не выявлено значимого влияния использования источника света при инкубировании посевов. Вероятно, фотовозбуждение, получаемое при постановке теста (не более 10 мин), является достаточным для антимикробного воздействия КТ.

Вариабельность результатов демонстрирует в ряде случаев увеличение активности биоконъюгатов по сравнению чистым препаратом антибиотика. Так, увеличение ЗЗР к левофлоксацину на 3мм выявлено у амбулаторного штамма *S. aureus* под воздействие источником возбуждения с обоими типами КТ.

У госпитального штамма того же вида – на 4 мм, при этом эффект отмечен как при фото-возбуждении, так и без него.

В тоже время у амбулаторных и госпитальных штаммов *S. epidermidis* повышение активности левофлоксацина при его комбинации с КТ не выявлено.

При изучении комбинации антибиотик-КТ показано в ряде случаев значимое увеличение ЗЗР и в отношении грамотрицательной флоры. Так, *E.coli* при комбинации с цефотаксимом ЗЗР увеличилась с 27мм до 32мм, с цефтазидимом. - с 24 мм до 30 мм. Для *P.aeruginosa* при природной устойчивости к цефотаксиму (ЗЗР 16мм и 6 мм для амбулаторного и госпитального штамма) в комбинации с КТ произошло значительное увеличение показателя - до 29 мм и 21-23мм соответственно. Выявлен эффект синергизма КТ и цефотаксима и цефтазидама в отношении *E. coli*, *Kl.pneumoniae* и *Ps.aeruginosa*.

ВЫВОДЫ

В ходе работы была отработана методология определения чувствительности КТ и их биоконъюгатов. Отмечено, что источник возбуждения и концентрация КТ не оказывают существенного влияния на чувствительность микроорганизмов при данном дизайне эксперимента.

Получены первые результаты, свидетельствующие об антибактериальном эффекте КТ CdTe/Cd и InP/ZnSe/ZnS и их комбинации с антибиотиками на амбулаторные и госпитальные штаммы бактерий. Особый интерес представляет возможность использования данных препаратов в отношении высокорезистентных микроорганизмов, в т.ч. наличие антисинегнойной активности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Хлебцов Н.Г. Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом. / Хлебцов Н.Г. // Квантовая электроника. - 2008 - Т.38, № 6. С. 504–529.
2. Галанов А.И. Разработка магнитоуправляемой системы для доставки химиопрепаратов на основе наноразмерных частиц железа. / Галанов А.И., Юрмазова Т.А., Савельев Г.Г. // Сибирский онкологический журнал. - 2008. - Т.3, № 27. - С. 50–57.
3. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021)» [электронный ресурс] URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (Дата обращения: 10.02.2023)

Сведения об авторах

М.В. Кырф* – врач-

В.Я. Пономарев – кандидат медицинских наук

С.М. Розанова – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

M.V. Kyrf – Postgraduate student

V.Ya. Ponomarev – Candidate of Sciences (Medical)

S.M. Rozanova – Candidate of Sciences (Medical), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

flame.teddy@gmail.com

УДК 001.891.53

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОДСЧЕТА ШИСТОЦИТОВ РУЧНОЙ МИКРОСКОПИЕЙ И АВТОМАТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ КРОВИ SYSMEX XN-1000

Ирина Сергеевна Леонгард¹, Леонид Иосифович Савельев^{1,2}

¹Кафедра лабораторной диагностики и бактериологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

²ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Процент фрагментированных эритроцитов в периферической крови является важным показателем ранней диагностики тромботической микроангиопатии, связанной с трансплантацией костного мозга. Золотым стандартом в определении шистоцитов остается микроскопия мазка периферической крови. Такой подход отнимает много времени, поэтому для автоматического анализатора крови был разработан параметр FRC%. Однако же показатель FRC% определяемый на анализаторе Sysmex XN-1000, дал завышение в сравнении с результатами микроскопии при FRC% в крови менее 1%. **Цель исследования** - сравнение показателя FRC% определяемого на анализаторе Sysmex XN-1000 с результатами микроскопии и выявлении факторов в периферической крови, влияющих на итоговый показатель FRC% определяемый на анализаторе Sysmex XN-1000 у детей с подозрением на ТМА после трансплантации костного мозга. **Материал и методы.** Была набрана группа из 8 пациентов с января 2022 года по октябрь 2022 после трансплантации костного мозга в ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница». Шистоциты исследовались в динамике, в зависимости от состояния пациентов. Исследовано 40 проб крови на анализаторе Sysmex XN-1000 проточной цитофлуориметрией с подсчетом FRC% и в мазках крови. **Результаты.** Ручную микроскопию шистоцитов нельзя заменить анализатором крови. Выявлена корреляция шистоцитов с показателями: лейкоцитами, тромбоцитами, большими тромбоцитами, средним объемом тромбоцитов. **Выводы.** Доступность автоматизированных подсчетов FRC% представляет