

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА *IN VITRO* И *IN VIVO*
В ОТНОШЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

А.В. Захаров¹, А.Л. Хохлов²

¹Ярославская областная клиническая туберкулезная больница, отделение легочного туберкулеза;

²ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической фармакологии
с курсом института последипломного образования

В работе представлены результаты экспериментальных исследований по изучению противотуберкулезной активности наночастиц серебра. В опытах *in vitro* на материале 117 штаммов МБТ с устойчивостью к изониазиду и другим препаратам при сохраненной чувствительности к рифампицину (1-я группа) и 108 МЛУ штаммов МБТ (2-я группа) продемонстрировано бактерицидное действие наночастиц соответственно в 48,1 и 41,7 % наблюдений. При сочетанном применении наночастиц с изониазидом аналогичные показатели составили 65,3 и 60,5 % соответственно ($p < 0,05$). На модели экспериментального туберкулеза у мышей имбредной линии BALB/c лучшие показатели выживаемости и высеваемости возбудителя из лёгочной ткани также наблюдались при сочетанном использовании наночастиц и изониазида. Полученные результаты позволяют предлагать наночастицы серебра в качестве адьюванта химиотерапии для клинических исследований.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулез, изониазид, наночастицы серебра.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-3(67)-43-46

**THE RESULTS OF THE RESEARCH ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES
IN VITRO AND *IN VIVO* AGAINST DRUG-RESISTANT
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS**

A.V. Zaharov¹, A.L. Hohlov²

¹Yaroslavl regional clinical tuberculosis hospital, a branch of the pulmonary tuberculosis;

²FSBEI HE «Yaroslavl state medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of clinical pharmacology with the course of the Institute postgraduate education

The paper presents the results of experimental studies on the antitubercular activity of silver nanoparticles. *In vitro* experiments on 117 MBT strains with resistance to isoniazid and other drugs with preserved sensitivity to rifampin (group 1) and 108 ml of MBT strains (group 2), bactericidal action of nanoparticles was demonstrated in 48,1 and 41,7 % of cases, respectively. With the combined use of nanoparticles with isoniazide, similar indicators were 65,3 and 60,5 %, respectively ($p < 0.05$). In the model of experimental tuberculosis in BALB/C mice, the best survival and seeding rates of the pathogen from the lung tissue were also observed with the combined use of nanoparticles and isoniazide. The results obtained allow us to offer silver nanoparticles as adjuvants of chemotherapy for clinical trials.

Key words: experimental tuberculosis, isoniazid, silver nanoparticles.

Туберкулез продолжает представлять серьезную угрозу человечеству. Ежегодно он становится причиной смерти около 1,5 млн человек на планете, не считая умерших от туберкулеза при ВИЧ-инфекции [2]. В России в 2017 г. показатель смертности от туберкулеза составил 6,4 на 100 тыс. населения [4]. Несмотря на стабилизацию и положительные тенденции в развитии эпидемиологической ситуации по туберкулезу в России и мире, неблагоприятный прогноз в ближайшие годы будет определяться двумя важнейшими факторами – увеличением количества ВИЧ-инфицированных и ростом множественной лекарственной устойчивости МБТ (МЛУ-МБТ) [1]. По данным официальной статистики, сочетание туберкулеза с ВИЧ-инфекцией в РФ увеличилось за период 2013–2017 гг. с 6,4 до 8,3 на 100 тыс. населения. За этот же период количество больных, выделяющих возбудителя с МЛУ-МБТ, возросло с 17,4 до 27,4 на 100

тыс. населения. В связи недостаточной эффективностью лечения и критическим ростом устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам, в Федеральных клинических рекомендациях по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя (2015) рекомендуется проводить научный поиск средств, потенцирующих действие противотуберкулезных препаратов и называемых адьювантами химиотерапии, то есть веществами, усиливающими или пролонгирующими действие лекарственных средств. В мировой и отечественной научной литературе опубликованы результаты многочисленных исследований, свидетельствующие о выраженной антибактериальной активности наночастиц серебра на широкий круг инфекционных агентов, в том числе на лекарственно-устойчивые штаммы [3, 5, 7–10]. Эти исследования явились предпосылкой для изучения

противотуберкулезной активности наночастиц. Модельным препаратом для изучения потенцирующих свойств наночастиц был выбран изониазид, учитывая его высокую актуальность в режимах современной химиотерапии и профилактики туберкулеза, в том числе у ВИЧ-инфицированных пациентов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка в эксперименте способов повышения эффективности лечения туберкулеза с устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину путем научного обоснования эффективности применения в сочетании с химиотерапией наночастиц серебра.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали водный раствор наночастиц серебра, полученный электрохимическим методом, с размером наночастиц 3–60 нм. *In vitro* изучали подавляющую активность наночастиц серебра на МБТ в изолированном варианте и в сочетании с изониазидом. Тестировали концентрации наночастиц – 5; 25 и 50 мкг/мл. Концентрация изониазида составляла 1 мкг/мл. Исследования проводили на 117 клинических изолятах МБТ с устойчивостью к изониазиду и другим препаратам при сохраненной чувствительности к рифампицину (1-я группа) и 108 изолятах с МЛУ-МБТ (2-я группа). Антибактериальную активность наночастиц серебра оценивали по способности подавлять рост лекарственно устойчивых штаммов микобактерий, которая рассчитывалась по соотношению количества колонии образующих единиц (КОЕ) в контрольных и опытных образцах. Протокол исследования соответствовал действующим на момент выполнения научной работы нормативным документам – «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», 2005, приложением к Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» [6]. При полном или значительном подавлении роста МБТ, то есть при росте до 20 колоний, результат оценивали как бактерицидный, при умеренном подавлении – как бактериостатический. Модель туберкулеза создавали на мышах имбредной линии BALB/c, используя двухнедельную вирулентную культуру *M. tuberculosis* клинического штамма, полученного от больного туберкулезом, с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду (1 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (25 мкг/мл). Подопытных животных заражали внутривенно в область ретроорбитального синуса, при этом инфицирующая доза составляла 5×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ). Основными критериями эффективности лечения являлись: показатели *выживаемости* животных и *высеваемости* МБТ из лёгочной ткани. Высеваемость возбудителя определяли как среднее значение из общего количества колониеобразующих единиц на каждую группу. Интенсивность роста культуры определяли в условных

единицах (у. е.) по четырехбалльной системе, предложенной Г.Н. Першиным [6]. Статистическую достоверность показателей оценивали с использованием коэффициента Стьюдента, рассчитываемого по формуле: $t = \frac{M1-M2}{\sqrt{m1^2 + m2^2}}$, считая разницу достоверной при вероятности 95 % и более ($p < 0,05$). Статистическую обработку проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 и статистической компьютерной программы «Биостатика».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты подавляющей активности наночастиц серебра на клинические изоляты возбудителя в монорежиме и в сочетании с изониазидом представлены в диаграмме на рис. 1. Бактерицидное действие (полное и значительное подавление роста возбудителя) изолированных наночастиц на изоляты 1-й группы наблюдалось в 48,1 % опытов, бактериостатическое – в 29,6 %. При сочетанном использовании наночастиц с изониазидом (нанокompозит) аналогичные показатели составили 65,3 и 21,9 % соответственно. Таким образом, прирост бактерицидного действия в 1-й группе составил 17,2 % ($p < 0,05$).

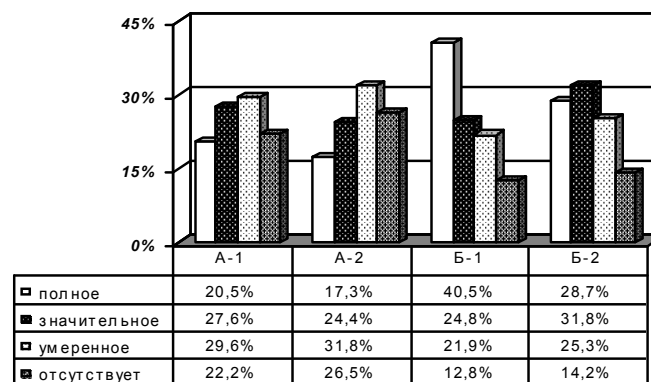


Рис. 1. Подавление роста изолятов МБТ. А (1–2-я группы) – изолированные наночастицы, Б (1–2-я группы) – нанокompозит

Во 2-й группе при использовании наночастиц в монорежиме бактерицидный эффект составил 41,7 %, бактериостатический – 31,8 %. Применение нанокompозита обеспечило бактерицидное действие в 60,5 %, бактериостатическое – в 25,3 % наблюдений. Таким образом, прирост бактерицидного действия во 2-й группе составил 18,8 % ($p < 0,05$). Результаты изучения подавляющей активности наночастиц серебра *in vitro* свидетельствуют о самостоятельной противотуберкулезной активности наночастиц, а также о синергидном эффекте совместного применения их с изониазидом.

В эксперименте *in vivo* изучали противотуберкулезную эффективность наночастиц серебра в монорежиме и в составе нанокompозита с изониазидом. В контрольной А-группе было 10 инфицированных мышей линии BALB/c, не получавших лечение. В контрольной

В-группе 10 мышей получали лечение изониазидом в дозе 50 мг/кг. В экспериментальных С- и D-группах по 20 особей в каждой животные получали лечение соответственно наночастицами в монорежиме и наноконкомпозитом. В соответствии с протоколом эксперимента, опыт заканчивался на момент гибели всех мышей, не получавших лечение. Динамика гибели экспериментальных животных представлена в табл. Из представленных данных следует, что максимальная выживаемость (90 %) на момент окончания эксперимента наблюдалась в группе D, где в лечении использовался наноконкомпозит. Выживаемость 40 % отмечена при лечении изониазидом, при этом следует отметить, что возбудитель, которым инфицировали мышей, имел устойчивость к этому препарату. Тем не менее, наблюдался протективный эффект, вероятно, связанный с более высокими дозами изониазида, применявшимися в лечении. Наночастицы в монорежиме, которые использовались при лечении животных в группе С, также оказали положительное влияние на выживаемость мышей. Таким образом, наиболее высокую эффективность в лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулеза продемонстрировал наноконкомпозит, состоящий из наночастиц серебра и изониазида. Проводя анализ полученных результатов, можно говорить о потенцирующем действии наночастиц на изониазид, к которому МБТ имела устойчивость.

Показатели высеваемости *M. tuberculosis* из легочной ткани экспериментальных животных представлены в диаграмме на рис. 2. Наименьший показатель высеваемости, свидетельствующий о наибольшей эффективности лечения, зафиксирован в D-группе, где наночастицы применялись совместно с изониазидом. Разница показателей высеваемости при лечении наноконкомпозитом в сравнении с другими группами животных статистически достоверна ($p < 0,05$). Таким образом, по критерию высеваемости МБТ из лёгочной ткани приоритет в лечении принадлежит совместному применению наночастиц серебра и химиопрепарата изониазид, что также свидетельствует о синергизме применяемых компонентов. Повторное исследование лекарственной устойчивости выделенного из лёгочной ткани животных возбудителя соответствовало изначальному спектру резистентности МБТ.

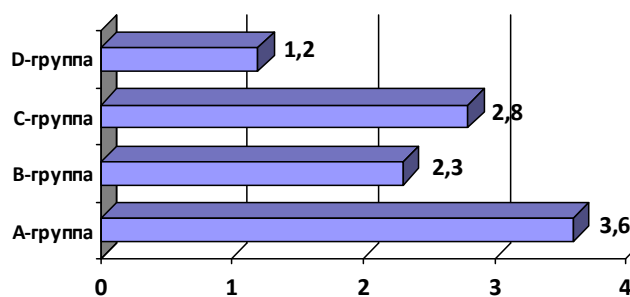


Рис. 2. Высеваемость МБТ из лёгочной ткани мышей

Динамика гибели мышей

Группы	Количество мышей	Динамика гибели животных							Всего погибли	Всего выжили	Индекс выживаемости, %
		сроки после заражения									
		10 дней	20 дней	25 дней	30 дней	35 дней	40 дней	45 дней			
A	10	–	–	–	2	6	1	1	10	0	0
B	10	–	–	–	–	3	3	–	6	4	40
C	20	–	–	–	4	5	4	–	13	7	35
D	20	–	–	–	–	–	1	1	2	18	90

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Наночастицы серебра в эксперименте *in vitro* продемонстрировали бактерицидное действие на устойчивые к изониазиду штаммы возбудителя туберкулеза в монорежиме в 48,1 % случаев, при сочетанном применении с изониазидом – в 65,3 % ($p < 0,05$). На МЛУ штаммы МБТ аналогичные показатели составили соответственно 41,7 и 60,5 % ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о возможном потенцирующем эффекте наночастиц на изониазид.

2. В эксперименте *in vivo* максимальная результативность по критериям выживаемости инфицированных животных и показателю высеваемости МБТ из лёгочной ткани наблюдалась при сочетанном применении наночастиц серебра с изониазидом, при этом к изониазиду возбудитель имел устойчивость.

3. Полученные экспериментальным путем *in vitro* и *in vivo* результаты, свидетельствующие о противотуберкулезной активности наночастиц серебра, позволя-

ют рассматривать их как кандидата в адъюванты химиотерапии лекарственно-устойчивого туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Глобальные отчеты Всемирной организации здравоохранения по туберкулезу: формирование и интерпретация // Туберкулез и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 7–16. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-5-7-16.
2. ВОЗ. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом 2017 год [Электронный ресурс]. URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017executive_summary_ru.pdf?ua=1.
3. Егорова Е.М., Кубатиев А.А., Швецов В.И. Биологические эффекты наночастиц металлов. – М.: Наука, 2014. – 350 с.
4. Нецаева О.Б. Основные показатели по туберкулезу в Российской Федерации [Электронный ресурс]. URL: <http://mednet.ru/images/stories/tb2017.pdf>.

5. Радциг М.А. Взаимодействие клеток бактерий с соединениями серебра и золота: влияние на рост, образование биоплёнок, механизмы действия, биогенез наночастиц: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2013. – 24 с.

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.

7. Хохлов А.Л., Крейцберг Г.Н., Завойстый И.В. и др. Исследование антибактериальной эффективности коллоидных растворов наночастиц серебра // Новости здравоохранения. – 2007. – № 2. – С. 55–59.

8. Banu A., Rathod V. Biosynthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles and their Activity against Mycobacterium tuberculosis [Electronic resource] // J. Nanomed. Biotherapeut. Discov. – 2013. – № 3. – P. 1 URL: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-983X.1000110>.

9. Halawani E.M. Rapid Biosynthesis Method and Characterization of Silver Nanoparticles Using Zizyphus spina Christi Leaf Extract and Their Antibacterial Efficacy in Therapeutic Application [Electronic resource] // J. of Biomaterials and Nanobiotechnology. – 2017. – № 8. – P. 22–35. URL: <http://www.scirp.org/journal/jbnb>.

10. Tamayo L.A., Zapata P.A., Vejar N.D., Azócar M.I. Gulppe M.A., Zhou X. et al. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes* // Mat. Sci. Eng. – 2014. – № 40. – P. 24–31. DOI: 10.1016/j.msec.2014.03.037.

2017]. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017executive_summary_ru.pdf?ua=1.

3. Egorova E.M., Kubatiev A.A., SHvec V.I. Biologicheskie ehffekty nanochastic metallov [Biological effects of nanoparticles of metals]. Moscow: Nauka, 2014. 350 p.

4. Nechaeva O.B. Osnovnye pokazateli po tuberkulozu v Rossijskoj Federacii [EHlektronnyj resurs]. Available at: <http://mednet.ru/images/stories/tb2017.pdf>.

5. Radcig M.A. Vzaimodejstvie kletok bakterij s soedineniyami serebra i zlota: vliyanie na rost, obrazovanie bioplyonok, mekhanizmy dejstviya, biogenez nanochastic: Avtoref. dis. ... kand. med. nauk [The interaction of bacterial cells with compounds of silver and gold: impact on growth, biofilm formation, mechanisms of action, biogenesis of nanoparticles. Ph. D. (Medicine) Thesis]. Moscow, 2013. 24 p.

6. Rukovodstvo po ehksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances]. In corresponding member of RAMS, Professor R.Y. Khabriev (ed). Moscow: ОАО «Izdatel'stvo «Medicina», 2005. 832 p.

7. Hohlov A.L., Krejcbberg G.N., Zavojsstj I.V. i dr. Issledovanie antibakterial'noj ehffektivnosti kolloidnyh rastvorov nanochastic serebra [Study of the antibacterial efficiency of colloidal solutions of silver nanoparticles]. Novosti zdravooxraneniya [Health news], 2007, no. 2, pp. 55–59. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Banu A., Rathod V. Biosynthesis of Monodispersed Silver Nanoparticles and their Activity against Mycobacterium tuberculosis [Electronic resource]. J. Nanomed. Biotherapeut. Discov., 2013, no. 3, p. 1 Available at: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-983X.1000110>.

9. Halawani E.M. Rapid Biosynthesis Method and Characterization of Silver Nanoparticles Using Zizyphus spina Christi Leaf Extract and Their Antibacterial Efficacy in Therapeutic Application [Electronic resource]. J. of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2017, no. 8, pp. 22–35. UR Available at: <http://www.scirp.org/journal/jbnb>.

10. Tamayo L.A., Zapata P.A., Vejar N.D., Azócar M.I. Gulppe M.A., Zhou X. et al. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. Mat. Sci. Eng., 2014, no. 40, pp. 24–31. DOI: 10.1016/j.msec.2014.03.037.

REFERENCES

1. Vasil'eva I.A., Belilovskij E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. Global'nye otchety Vsemirnoj organizacii zdravooxraneniya po tuberkulezu: formirovanie i interpretaciya [The Global report of the world health organization on tuberculosis: development and interpretation]. Tuberkuloz i bolezni lyogkih [Tuberculosis and lung disease], 2017, Vol. 95, no. 5, pp. 7–16. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-5-7-16. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. VOZ. Doklad o global'noj bor'be s tuberkulezom 2017 god [EHlektronnyj resurs] [WHO. Report on the global tuberculosis

Контактная информация

Захаров Андрей Владимирович – к. м. н., зав. отделением государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ярославской области «Областная клиническая туберкулезная больница», e-mail: Yrzahan@mail.ru