

УДК 579.61:616-002

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА МЫШЕЙ

© 2020 г. О. В. Калмантаева<sup>1</sup>, \*, В. В. Фирстова<sup>1</sup>, Н. С. Грищенко<sup>1</sup>,  
Т. И. Рудницкая<sup>1</sup>, В. Д. Потапов<sup>1</sup>, С. Г. Игнатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>“Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии” Роспотребнадзора,  
Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

\*e-mail: kalmantaevaov@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.09.2019 г.

После доработки 10.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Исследовали антибактериальную активность наночастиц серебра размером  $43.6 \pm 10.7$  нм в отношении штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в экспериментах *in vitro* (изученные концентрации наночастиц 0.1, 1.0, 10, 25 и 50 мкг/мл) и на экспериментальной мышинной модели хронического туберкулеза. Показано, что наночастицы серебра в концентрации 50 мкг/мл подавляли рост микобактерий *in vitro* в 2 раза. Ингаляционное введение наночастиц серебра в дозе 0.1 мг/кг мышам, больным туберкулезом, приводило к снижению обсемененности легких и селезенки *M. tuberculosis* на 2 порядка. У этих животных снижалось количество белка в жидкости бронхо-легочного лаважа в 2 раза до показателя  $1908.5 \pm 105.7$  ( $P < 0.001$ ), что свидетельствовало об уменьшении воспалительных процессов в легких; увеличивался уровень продукции активных форм кислорода нейтрофилами, отражающий их бактерицидный потенциал, который до лечения был снижен в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой животных ( $P < 0.001$ ). После введения наночастиц серебра было отмечено восстановление соотношения популяций лимфоцитов в селезенке и цитокинового баланса, выраженное в снижении уровней интерферона-гамма (ИФН- $\gamma$ ), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа у больных туберкулезом мышей. Таким образом, впервые было показано, что ингаляционное введение наночастиц серебра, стабилизированных поливинилпирролидоном, приводило не только к заметному бактерицидному эффекту, но и восстанавливало баланс иммунной системы мышей.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, наночастицы серебра, лимфоциты, нейтрофилы, проточная цитофлуорометрия, цитокины, окислительный взрыв

**DOI:** 10.31857/S0555109920020087

Туберкулез (ТБ) является социально значимой инфекцией в мире. По данным Всемирной Организации Здравоохранения туберкулез — одна из десяти самых распространенных причин смерти в человеческой популяции. Несмотря на все проводимые мероприятия по борьбе с ТБ, уровень заболеваемости и смертности от данной инфекции остается высоким. В 2017 г. туберкулезом заболело 10 миллионов человек, а умерло около 1.3 миллиона человек [1].

Основным компонентом в лечении туберкулеза остается антибиотикотерапия. Однако противотуберкулезная химиотерапия имеет серьезные недостатки. Увеличивается резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к используемым антибиотикам, проявляется их побочное действие из-за длительности приема, больших доз и необходимости применять в комбинации сразу нескольких антибиотиков. Рекомендованные схемы ле-

чения имеют низкую эффективность, высокую стоимость и требуют длительного лечения [2].

Растущая заболеваемость ТБ и устойчивость микобактерий к антибиотикам побуждает ученых искать другие эффективные противотуберкулезные агенты. Сегодня в этой области разрабатываются несколько направлений, включающих использование моноклональных антител [3, 4], микобактериофагов [5, 6], бактериальных вакцин [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634041/>], иммуномодуляторов [7] и наночастиц серебра (НЧС) [8, 9]. С древних времен серебро являлось одним из основных антимикробных средств в медицине и использовалось в лечении инфекционных заболеваний. Терапевтические свойства серебра известны более 2000 лет [10]. В настоящее время развитие нанотехнологий позволило изменять размеры и свойства веществ на наноуровне, результатом чего стало увеличе-

ние антимикробного потенциала серебра путем использования его в форме наночастиц. Применение серебра в виде наночастиц позволяет в сотни раз снизить концентрацию серебра с сохранением бактерицидных свойств [11] и использовать данные препараты в медицине (перевязочные материалы, покрытия медицинских приборов, антимикробные препараты) [https://link.springer.com/article/10.1186/2228-5326-2-32, 12]. Наночастицы серебра характеризуются бактерицидностью против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3199605/,13], включая антибиотикорезистентные штаммы [14]. В ряде научных работ показана антибактериальная активность НЧС в отношении микобактерий, в том числе лекарственно-устойчивым клиническим изолятам, а также отмечается значительное увеличение эффективности применения противотуберкулезных антибиотиков в комбинации с наночастицами серебра [8, 9, 15]. Изучение взаимосвязи проводимого лечения с иммунным статусом больных туберкулезом является одним из наиболее важных и активно развивающихся направлений во фтизиатрии [16]. Ранее было показано, что наночастицы активны против *M. tuberculosis* со множественной устойчивостью к антибиотикам (https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02207/full), а ингаляционное введение наночастиц повышает эффективность антибиотиков [17]. Однако, вопрос одновременной оценки бактерицидной и иммуномодулирующей активности наночастиц, остается открытым. Недавно были опубликованы данные об одновременной оценке бактерицидной и иммуномодулирующей активности наномодифицированных поверхностей [18]. Но эта работа проводилась на других микроорганизмах и без применения животных моделей.

Цель работы – изучение антимикробной активности наночастиц серебра в отношении возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* и оценка иммунных показателей экспериментальных животных после воздействия данных наночастиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Наночастицы серебра.** В работе использовали водную дисперсию наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярным полимером медицинского назначения поливинилпирролидоном (НЧС-ПВП) (препарат “Арговит”, ООО НПЦ “Вектор-Вита”, Россия). В предыдущих исследованиях нанодисперсного компонента данного препарата было показано, что в нем содержится 1.0–1.4% серебра (по массе) и 18.6–19.0% ПВП с молекулярной массой 15–30 кДа, а средний диаметр наночастиц серебра составляет  $43.6 \pm 10.7$  нм [19, 20].

**Штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** Приготовление стоков *Mycobacterium tuberculosis* осу-

ществляли из лиофильно высушенной культуры, полученной из отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ (“ГКПМ – Оболенск” ФБУН ГНЦ ПМБ). Бактерии культивировали во флаконах объемом 100–500 мл в модифицированной жидкой среде Middelbrook 7H9 (“HiMedia”, Индия) с добавкой 10% ОАДС и 0.05% Твина 80 в течение 21 сут при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях. Культуры выращивали до оптической плотности, соответствующей  $5 \times 10^7$ – $10^8$  КОЕ.

**Определение антимикробной активности наночастиц серебра.** Определение антимикробной активности наночастиц серебра *in vitro* проводили суспензионным методом (МУ 3.5.2596-10). Для этого готовили рабочую суспензию штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в концентрации  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл, что обеспечивало возможность создания в смеси (наночастицы серебра с суспензией) концентрацию микроорганизмов порядка  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. Смешивали суспензию микобактерий и наночастиц серебра в соотношении 1 : 9. Проверяли концентрации 0.1, 1.0, 10, 25 и 50 мкг/мл. Концентрация 50 мкг/мл была максимальной для данного препарата, поэтому ингибирующее действие оценивали не по значению минимальной ингибирующей концентрации (МИК), а по подавлению роста (КОЕ) микобактерий. Экспозиция наночастиц серебра с микобактериями составила 1 ч при 37°C. Данной экспозиции достаточно для необратимого взаимодействия наночастиц серебра с мембранными структурами бактерий. В контрольные пробирки вместо наночастиц добавляли забуференный физиологический раствор. После экспозиции из смеси проводили посев из каждой пробы по 0.1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой Middlebrook 7H11 AgarBase (“HiMedia”, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС и культивировали в термостате при 37°C 21 сут. Затем проводили подсчет КОЕ.

**Экспериментальные животные.** В работе использовали мышей линии C57Bl/6: самки в возрасте 7–8 нед., весом 18–20 г. Животные были получены из филиала “Андреевка” “Научный центр биомедицинских технологий” Российской академии медицинских наук (пос. Андреевка, Россия). Мышей содержали группами по 5 животных в микроизоляторах. В свободном доступе мыши получали стандартный гранулированный корм и питьевую воду.

**Схема эксперимента.** Животные были разделены на три группы (две опытные и контрольная) по 15 мышей в каждой. Животные опытных групп были заражены штаммом *M. tuberculosis* H37Rv внутрибрюшинно введением 0.2 мл суспензии микобактерий в забуференном физиологическом растворе в дозе  $5 \times 10^4$  КОЕ/животное (мышинная модель экспериментального хронического туберкулеза). Через 4 мес. мышей из одной опытной группы (ТБ+НЧС-ПВП) ингаляционно обрабо-

тали НЧС-ПВП в аэрозольной камере CO 099C A4224 (“GLAS-COL Apparatus”, США). При ингаляционном введении аэрозоль генерировался из водной дисперсии наночастиц серебра калиброванным стеклянным распылителем, представляющим конструктивно трубку Вентури с объемом распыляемой жидкости до 7 см<sup>3</sup>. Введение препарата проводили однократно в дозе 0.1 мг наночастиц серебра на 1 кг массы тела. Мышей из второй опытной группы (ТБ) через 4 мес. после заражения ингаляционно однократно обработали физиологическим раствором аналогичным способом. Контрольная группа животных (контроль) — здоровые мыши, однократно ингаляционно обработанные физиологическим раствором аналогичным способом. Микробиологические высевы из легких и селезенки опытных групп животных проводили на 1, 10 и 30 сут после обработки наночастицами серебра. Оценку иммунных показателей проводили у мышей всех групп животных. Изучение многократного ингаляционного воздействия наночастиц серебра на аналогичные иммунные показатели здоровых мышей в дозе 0.1 мг/кг было проведено и опубликовано ранее [20].

**Определение КОЕ *M. tuberculosis*.** Определение КОЕ *M. tuberculosis* H37Rv в органах зараженных животных проводили высевам гомогенатов органов в 10-кратном разведении в забуференном физиологическом растворе на плотную питательную среду Middelbrook 7H11 AgarBase (“Himedia”, Индия) с добавлением 10%-ной сыворотки КРС. Учет колоний проводили на 28 сут.

**Получение культуры спленоцитов** [21]. Селезенки опытных и контрольных групп мышей стерильно гомогенизировали через капроновый фильтр в среду RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия). Клеточную суспензию отмывали путем центрифугирования при 250 г по 10 мин. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде RPMI-1640. Число жизнеспособных клеток определяли в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточного счетчика Countess™ (“Invitrogen”, Корея). Количество жизнеспособных спленоцитов довели до концентрации  $5 \times 10^6$  кл./мл.

**Получение нейтрофилов перитонеального экссудата** [21]. Для рекрутизации нейтрофилов в брюшную полость мышам вводили внутрибрюшинно 2 мл мясо-пептонного бульона и через 2 ч эвтаназировали мышей. После декапитации и обескровливания животного асептически готовили рабочую область. Затем делали небольшое отверстие в брюшной стенке и пятикратно промывали брюшную полость холодным (4°C) раствором Хенкса. Полученную из брюшной полости клеточную суспензию помещали на ледяную баню и использовали для экспериментов не позже, чем через 1 ч после получения. Число жизнеспособных клеток определяли в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточ-

ного счетчика Countess™ (“Invitrogen”, Корея). Количество жизнеспособных нейтрофилов довели до концентрации  $5 \times 10^6$  кл./мл.

**Определение субпопуляционного состава лимфоцитов и количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов селезенки.** Определение проводили методами проточной цитофлюорометрии как описано [21, 22]. Спленоциты ( $5 \times 10^6$  кл./мл) опытных и контрольных групп мышей окрашивали моноклональными антителами CD3 PerCP, CD4 APC, CD8 PE, CD19 APC, IFN- $\gamma$  FITC и TNF- $\alpha$  APC (“eBioscience”, США) в течение 20 мин в темноте при 20°C в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере и фиксировали 1%-ным раствором формалина. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Процентное содержание субпопуляций клеток в образцах определяли с использованием программы “CellQuest Pro”.

**Определение количества ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа.** Определение проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов “Mouse IFN- $\gamma$  ELISA” и “TNF- $\alpha$  ELISA” (“Bender MedSystems”, Австрия) в соответствии с руководством производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 450 нм.

**Определение продукции активных форм кислорода нейтрофилами методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ).** В каждую лунку 96-луночного планшета вносили суспензию нейтрофилов ( $5 \times 10^6$  кл./мл), для усиления ХЛ применялся раствор люминола с концентрацией  $5.6 \times 10^{-4}$  М (“BioChemika”, Чехия). В качестве индуктора фагоцитоза был использован опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл (“Sigma”, США). Значение ХЛ измерялось 6 раз на универсальном планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при 37°C. Длительность одного измерения составляла 10 мин. Интенсивность хемилюминесценции выражали количеством импульсов, накопленных за одно измерение.

**Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа.** Определение проводили с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (“Sigma”, США). Оптическую плотность измеряли на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 562 нм.

**Статистическая обработка результатов.** Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия между группами признавали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

**Таблица 1.** Содержание субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей (%)

Показатель	Содержание лимфоцитов в селезенке мышей линии C57Bl/6, %			
	Т-лимфоциты	Т-хелперы	цитотоксические лимфоциты	В-лимфоциты
ТБ	41.89 ± 2.25*	28.47 ± 1.37*	4.13 ± 0.18	27.14 ± 1.38*
ТБ + НЧС-ПВП	37.23 ± 1.85	24.31 ± 1.23	5.54 ± 0.27	34.02 ± 1.72
Контроль	36.12 ± 1.72	23.02 ± 1.15	6.32 ± 0.31	35.41 ± 1.82

\* Статистически значимое различие по сравнению с контролем при  $P < 0.05$ . Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

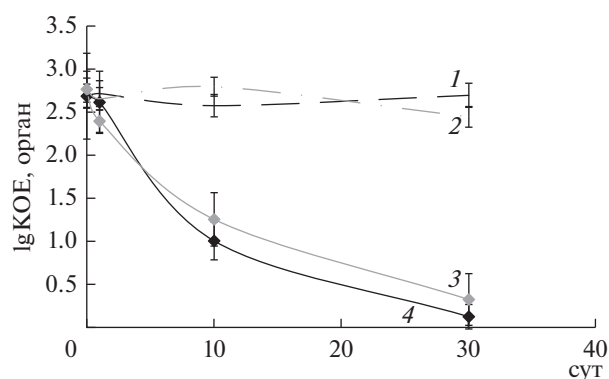
Результаты определения антимикробной активности наночастиц серебра разной концентрации *in vitro* представлены в табл. 1. Подавление роста микобактерий штамма *M. tuberculosis* H37Rv на плотной питательной среде Middelbrook 7H11 AgarBase (“Himedia”, Индия) с добавлением 10% сыворотки КРС наблюдалось после экспозиции в суспензии с НЧС-ПВП в концентрациях 10, 25 и 50 мкг/мл. Количество выросших КОЕ микобактерий снижалось в 2 раза после воздействия НЧС-ПВП в концентрации 50 мкг/мл (табл. 1).

В экспериментах, проведенных на мышах с хронической формой туберкулеза, до введения НЧС-ПВП среднее количество микобактерий в легких было  $4.2 \times 10^2$  КОЕ, а в селезенке –  $4.4 \times 10^2$  КОЕ. Через 10 сут после ингаляционного введения НЧС-ПВП животным наблюдалось резкое снижение обсемененности органов (среднее количество микобактерий в легких составило 10 КОЕ, а в селезенке – 21 КОЕ), которое сохранялось до 30 сут (рис. 1).

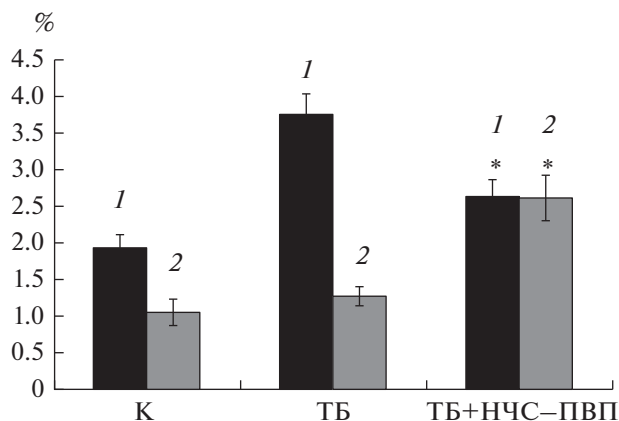
Полученные нами данные об антимикробной активности НЧС-ПВП в отношении *M. tuberculosis* H37Rv согласуются с работами других исследователей. Так, Selim et al. по-русски или в работе [9] показали, что минимальная подавляющая концентрация наночастиц серебра (50 нм) для штамма *M. tuberculosis* H37Rv составила 1 мкг/мл [9]. Захаров с соавт., изучили совместное воздействие наночастиц серебра (3–60 нм) с изониазидом в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было установлено, что в сочетании с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл минимальная подавляющая концентрация наночастиц серебра для микобактерий составляла 2.5 мкг/мл. В экспериментах *in vivo* авторы определяли влияние НЧС на продолжительность жизни мышей, больных ТБ. Так, индекс выживаемости животных при использовании только НЧС в дозах 12.5 и 50 мкг/кг был равен индексу выживаемости животных, получавших изониазид в дозе 50 мг/кг, и составлял 40%. А при лечении НЧС в дозе 25 мкг/кг индекс выживаемости увеличивался до 60%. При совместном использовании НЧС с изониазидом (50 мг/кг) индекс выживаемости мышей составлял от 80 до 100% [15].

Течение и исход туберкулезной инфекции во многом определяется степенью активации Th1-лимфоцитов и фагоцитов [23]. Ключевая роль в формировании клеточного иммунного ответа при туберкулезной инфекции отводится различным субпопуляциям Т-лимфоцитов: CD4+–Т-лимфоцитам-хелперам, регулирующим фагоцитарную и бактерицидную активность макрофагов и CD8+ цитотоксическим-Т-лимфоцитам, способным оказывать прямое цитотоксическое действие на клетки, инфицированные микобактериями [24]. В группе больных ТБ мышей было выявлено увеличение относительного количества Т-лимфоцитов за счет субпопуляции Т-хелперов и снижение относительного количества цитотоксических-Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов в селезенке. В группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП относительное количество Т-лимфоцитов (в том числе Т-хелперов и цитотоксических-Т-лимфоцитов) и В-лимфоцитов в селезенке не отличалось от значений данных показателей в контрольной группе животных (табл. 2).

При микобактериальных инфекциях происходит преимущественное образование Т-лимфоци-



**Рис. 1.** Динамика снижения обсемененности органов *M. tuberculosis* у мышей, больных хроническим ТБ, в течение месяца после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП: 1 – обсемененность легких микобактериями в группе больных ТБ мышей; 2 – обсемененность селезенки микобактериями в группе больных ТБ мышей; 3 – обсемененность селезенки микобактериями в группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП; 4 – обсемененность легких микобактериями в группе больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП.

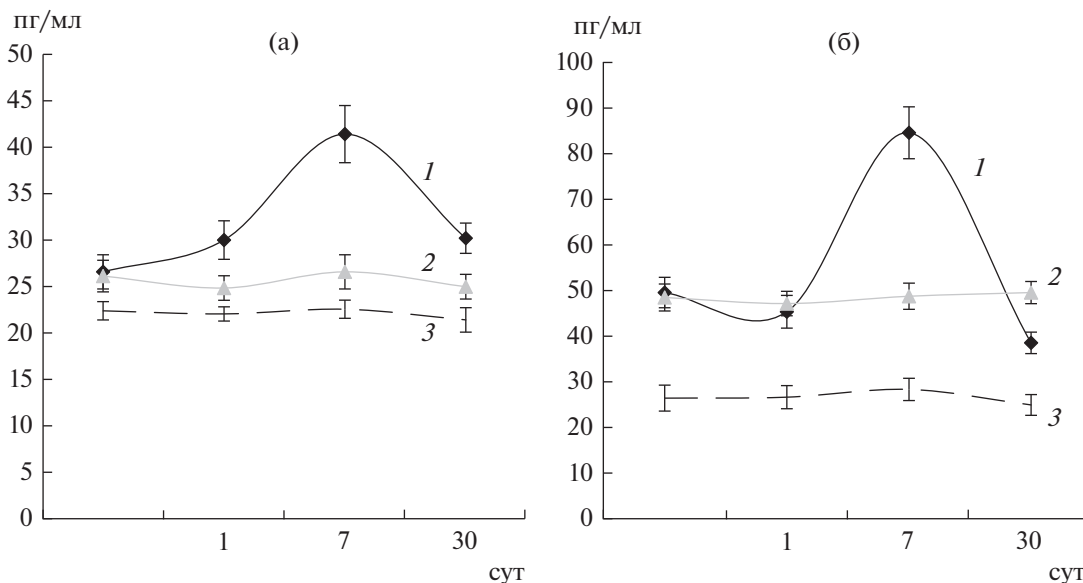


**Рис. 2.** Количество (%) продуцирующих цитокин Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ): 1 –  $CD3^+CD4^+IFN-\gamma^+$ ; 2 –  $CD3^+CD4^+IFN-\alpha^+$ . К (контроль) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ( $P < 0.05$ ).

тов 1 типа, характерными чертами которых является продукция цитокинов ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  [23]. Оба цитокина способны стимулировать антимикобактериальную активность макрофагов, чем в первую очередь, и обусловлен протективный эффект Т-хелперов. В проведенных экспериментах показано, что в группе мышей больных ТБ процентное содержание продуцирующих ИФН- $\gamma$  Т-хелперов возрастало в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 2). Ингаляционное введение НЧС-ПВП больным ТБ мышам приводило к снижению относительного количества ИФН-гамма-

продуцирующих лимфоцитов в селезенке. Можно предположить, что уменьшение относительного количества продуцирующих ИФН- $\gamma$  лимфоцитов в селезенке больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП вызвано уменьшением количества клеток *M. tuberculosis*. По мнению ряда авторов, высокое содержание продуцирующих ИФН- $\gamma$  лимфоцитов у больных туберкулезом является следствием перманентной стимуляции Т-клеток антигенами микобактерий и увеличением пула антигенспецифических Т-лимфоцитов. Лечение туберкулеза сопровождается снижением количества ИФН- $\gamma$ -позитивных клеток [25].

Изучение динамики изменения содержания свободного ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови больных ТБ мышей в течение месяца после введения НЧС-ПВП показало достоверное увеличение количества данного цитокина на 7 сут после воздействия. Содержание ИФН- $\gamma$  в группе больных ТБ мышей составляло  $26.6 \pm 1.83$  пг/мл, а на 7 сут после введения НЧС-ПВП –  $41.34 \pm 3.06$ ,  $P < 0.05$ . На 30 сут уровень ИФН- $\gamma$  снижился до  $30.20 \pm 1.62$  пг/мл, но оставался достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ (рис. 3а). В жидкости БЛЛ больных ТБ мышей на 7 сут после введения НЧС-ПВП также наблюдалось значительное увеличение содержания ИФН- $\gamma$  до значения  $85.00 \pm 5.68$  пг/мл по сравнению с уровнем данного цитокина до введения НЧС-ПВП ( $50.01 \pm 3.33$  пг/мл,  $P < 0.05$ ). На 30 сут после введения НЧС-ПВП содержание ИФН- $\gamma$  составляло  $39.00 \pm 2.35$  пг/мл, что достоверно ниже содержания данного цитокина в группе больных ТБ мышей ( $P < 0.05$ ) (рис. 3б). Значительное увеличение содержания данного



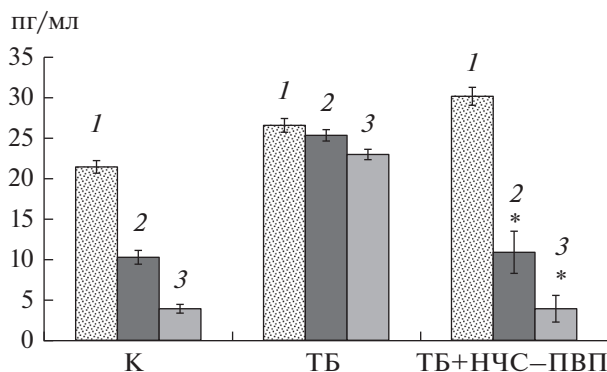
**Рис. 3.** Динамика изменения содержания ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови мышей (а) и в жидкости бронхо-легочного лаважа (б) в течение месяца. 1 – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП, 2 – группа больных ТБ мышей, 3 – группа здоровых мышей.

цитокина в сыворотке и жидкости БЛЛ через 7 сут после введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам по времени совпадало с уменьшением количества микобактерий в легких и селезенке. В работе [25] отмечается, что у больных туберкулезом уровень ИФН- $\gamma$  в крови снижен по сравнению со здоровыми лицами, а лечение туберкулеза сопровождалось повышением сывороточного уровня ИФН- $\gamma$ .

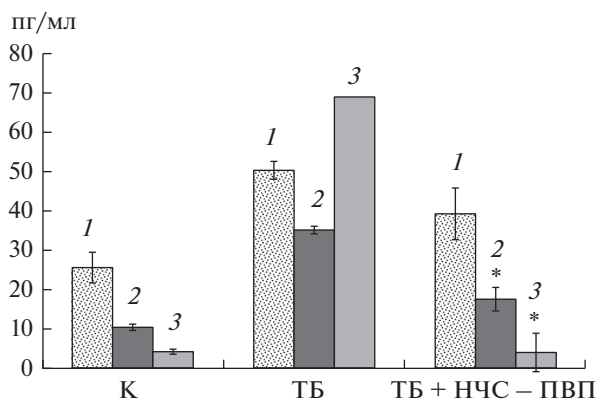
Несмотря на то, что ингаляционное введение НЧС-ПВП больным ТБ мышам приводило к увеличению относительного количества ФНО- $\alpha$ -продуцирующих Т-хелперов в селезенке (рис. 2), количество свободного ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови и жидкости БЛЛ — уменьшалось (рис. 4, 5), что указывало на снижение уровня воспалительных реакций организма [23, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761866>].

Для лучшего понимания воздействия НЧС-ПВП на течение хронического туберкулеза мы определили содержание противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 (ИЛ-4) в сыворотке крови и жидкости БЛЛ экспериментальных животных. В результате проведенных исследований в группе больных ТБ мышей было установлено значительное увеличение содержания свободного ИЛ-4 в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ в 6 и 17 раз соответственно относительно значений данных показателей в контрольной группе ( $3.67 \pm 0.72$  и  $4.12 \pm 0.64$  пг/мл,  $P < 0.001$ ). Через 30 сут после введения наночастиц серебра у мышей, больных ТБ, наблюдалось снижение уровня ИЛ-4 до  $4.23 \pm 1.08$  пг/мл в сыворотке крови и до  $3.91 \pm 0.55$  пг/мл в жидкости БЛЛ ( $P < 0.001$ ), что достоверно не отличалось от содержания ИЛ-4 в исследованных биологических жидкостях животных контрольной группы (рис. 4, 5). Фтизиатры отмечают, что при тяжелых формах туберкулезной инфекции, а также на ее поздних стадиях наблюдается локальное и системное повышение продукции ИЛ-4 [26]. Однако иммунный ответ с избыточной продукцией ИЛ-4 скорее является иммунопатологическим, чем защитным и не может уничтожить микобактериальную инфекцию (бактериостатический иммунный ответ) [27], поэтому снижение содержания ИЛ-4 является благоприятным прогностическим маркером после противотуберкулезной химиоиммунотерапии [28].

Нейтрофилы являются одними из первых клеток, которые мигрируют в очаг туберкулезной инфекции, где постепенно накапливаются с развитием хронической стадии заболевания [23, 29]. Нейтрофилы человека и мыши эффективно фагоцитируют микобактерии, участвуют в инициации Т-клеточного ответа [30, 31] и в образовании гранулемы [32]. Одним из механизмов бактерицидного действия нейтрофилов является продукция активных форм кислорода (окислительный взрыв) [33], уровень которой может быть измерен с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции. В нашей экспериментальной работе в группе боль-



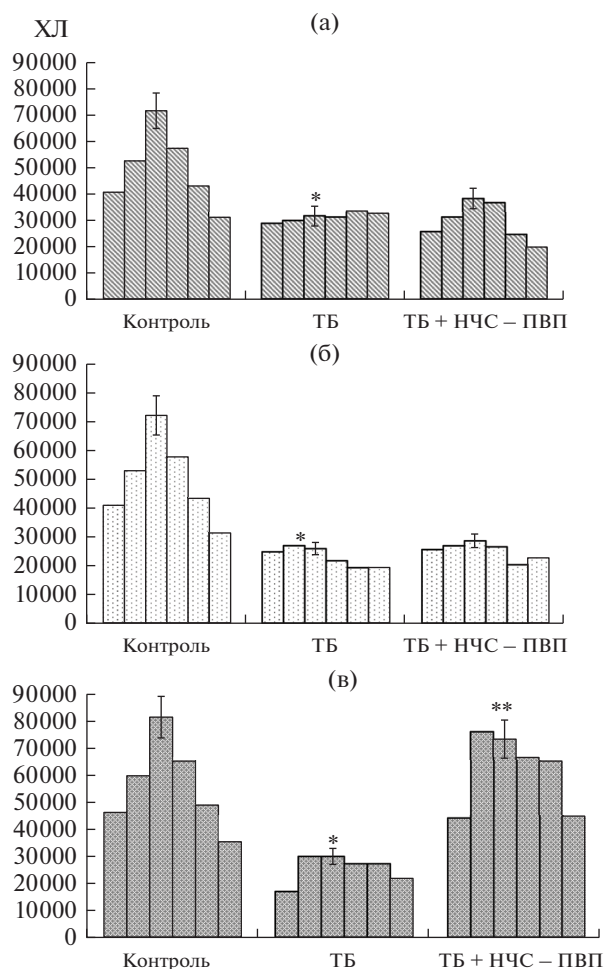
**Рис. 4.** Содержание цитокинов в сыворотке крови мышей: 1 – ИФН- $\gamma$ , 2 – ФНО- $\alpha$ , 3 – ИЛ-4. К (контроль) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП. \*Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ( $P < 0.001$ ).



**Рис. 5.** Содержание цитокинов в жидкости бронхолегочного лаважа мышей: 1 – ИФН- $\gamma$ , 2 – ФНО- $\alpha$ , 3 – ИЛ-4. К (контроль) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через 1 мес. после введения НЧС-ПВП. \*Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ( $P < 0.001$ ).

ных ТБ мышей наблюдалось достоверное снижение уровня продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами в 2.7 раза по сравнению с контрольной группой животных ( $P < 0.001$ ).

В группе больных мышей, обработанных НЧС-ПВП, через 1 и 7 сут после введения наночастиц также отмечалось снижение продукции АФК относительно контроля, однако через 30 сут было установлено достоверное увеличение данного показателя в 2.5 раза ( $P < 0.001$ ) относительно группы больных ТБ мышей, необработанных наночастицами серебра (рис. 6). Наблюдаемое в нашей работе снижение продукции АФК нейтрофилами у больных ТБ мышей согласуется с данными работы [34] или по русски фамилию, где отмечается, что у мышей, зараженных микобактериями, нарушается окислительный взрыв нейтрофилов. Уста-



**Рис. 6.** Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей в контроле и эксперименте после введения НЧС через 1 (а), 7 (б) и 30 (в) сут. Контроль (К) – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ + НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП. Значение ХЛ измерялось в течение 1 ч 6 раз, длительность одного измерения 10 мин. Каждый столбец – одно измерение. \* Результат статистически достоверен по сравнению с контролем ( $P < 0.001$ ). \*\* Результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ( $P < 0.001$ ).

новленное нами увеличение продукции АФК нейтрофилами через 30 сут после введения НЧС-ПВП опосредовано, скорее всего, снижением микобактериальной нагрузки организма.

Воспаление всегда сопровождает инфекцию и представляет собой важнейший компонент иммунной защиты хозяина. Однако гипервоспалительные реакции могут способствовать обострению заболевания [23]. Повышение концентрации белка в жидкости бронхо-легочного лаважа является одним из признаков легочного воспаления, так как отражает альвеолярно-капиллярную проницаемость [35]. Данный показатель был выбран нами для оценки уровня воспаления в легких экспериментальных животных. У мышей, больных

ТБ, наблюдалось увеличение содержания белка в жидкости БЛЛ в 4 раза по сравнению с таковым показателем в контрольной группе животных (табл. 3). После воздействия НЧС-ПВП количество белка в жидкости БЛЛ снижалось в 2 раза до показателя  $1908.5 \pm 105.7$  ( $P < 0.001$ ), что отражает уменьшение воспаления в легких (табл. 3).

На основании проведенной работы можно заключить, что наночастицы серебра обладают антимикробной активностью в отношении штамма *M. tuberculosis* H37Rv в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В проведенной нами работе отмечено восстановление иммунных показателей больных ТБ мышей после воздействия НЧС. В предыдущей работе [20] было показано, что многократное ингаляционное введение НЧС-ПВП здоровым мышам в той же дозе не вызывало иммунопатологических изменений у экспериментальных животных, поэтому НЧС могут рассматриваться в качестве перспективных препаратов в мероприятиях профилактики и лечения туберкулеза.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с “Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных” (Institute of Laboratory Animals Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. – National Academy Press: Washington. 1996. 138 с.)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Caminero J.A., Scardigli A. // Eur. Respir. J. 2015. V. 46. P. 887–893.
3. Balu S., Reljic R., Lewis M.J., Pleass R.J., McIntosh R., Kooten C. et al. // The J. Immunol. 2011. V. 186. № 5. P. 3113–3119.
4. Abate G., Hoft D.F. // ImmunoTargets and Therap. 2016. V. 5. P. 37–45.
5. Gondil V.S., Chhibber S. // Biomed. Biotechnol. Res. J. 2018. V. 2. № 1. P. 9–15.
6. Kiefer B., Dahl J.L. // Adv. Microbiol. 2015. V. 5. P. 699–710.
7. Abate G., Hoft D.F. // ImmunoTargets and Therapy. 2016. V. 5. P. 37–45.
8. Banu A., Rathod V. // J. Nanomed. Biotherapeut. Discov. 2013. V. 3. № 1. <https://doi.org/10.4172/2155-983X.1000110>
9. Selim A., Elhaig M.M., Taha S.A., Nasr E.A. // Rev. Sci. Tech. 2018. V. 37. № 3. P. 823–830.
10. Alexander, J.W. // Surg. Infect. (Larchmt). 2009. V. 10. № 3. P. 289–292.
11. Фастовец И.А., Верховцева Н.В., Пашкевич Е.Б., Непрусов А.И. // Проблемы агрохимии и экологии. 2017. № 1. С. 51–62.
12. Schierholz J.M., Lucas L.J., Rump A., Pulverer G. // J. Hospital Infection. 1998. № 40. P. 257–262.
13. Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G. et al. // Molecules. 2015. V. 20. P. 8856–8874.

14. Lara H.H., Ayala-Nuñez N.V., Ixtapan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 615–621
15. Захаров А.В., Эргешов А.Э., Хохлов А.Л., Кибрик Б.С. Эффективность сочетания изониазида и наночастиц серебра в лечении экспериментального туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2017. Т. 95. № 6. С. 51–58.
16. Аршинова С.С., Симонова А.В., Стаханов В.А., Пинегин Б.В. // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3. № 4. С. 567–573.
17. Ellis T., Chiappi M., García-Trenco A., Al-Ejji M., Sarkar S. et al. // CS Nano. 2018. V. 126. P. 5228–5240.
18. Ponomarev V.A., Sheveuko A.N., Pertuyakova E.S., Lee J., Voevodin A.A. et al. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. № 32. P. 28699–28719.
19. Шумакова А.А., Смирнова В.В., Тананова О.Н., Трушина Э.Н., Кравченко Л.В., Аксенов И.В. и др. // Вопросы питания. 2011. Т. 80. № 6. С. 9–18.
20. Калмантаева О.В., Фирстова В.В., Потапов В.Д., Зырина Е.В., Герасимов В.Н., Ганина Е.А. и др. // Российские нанотехнологии. 2014. Т. 9. № 9–10. С. 78–82.
21. Coligan J.E., Bierer E.B., Margulies H.D., Shevach E.M., Stroder W. Short rotocols in Immunology: a Compendium of Methods from Current Protocols in Immunology / Ed. J.E. Coligan. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc, 2005.
22. Kaufmann S.H.E., Kabelitz D. Methods in Microbiology. Immunology of infection. 2 Ed. / Ed. S.H.E. Kaufmann, D. Kabelitz. London: Acad. Press, 2002. V. 32. 806 p.
23. Cardona P.J. Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity / Ed. P.J. Cardona. Croatia: InTech, 2012. 560 p.
24. Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Михеева К.О., Игнатов М.В. и др. // Бюллетень сибирской медицины. 2012. № 1. С. 39–45.
25. Лядова И.В., Гергерт В.Я. // Туберкулез и болезни легких. 2009. № 11. С. 9–18.
26. Перельман М.И. Национальное руководство. Фтизиатрия / Ред. М.И. Перельмана. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 512 с.
27. Report of the Expert Consultation on Immunotherapeutic Interventions for Tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2007. @страницы
28. Лысов А.В., Никонов С.Д., Редькин Ю.В., Анфилофьева О.Ю., Казаков А.В., Буркова И.В. // Terra Medica Nova. 2009. № 4–5. С. 13–16.
29. Appelberg R. // Clin. Exp. Immunol. 1992. V. 89. P. 120–125.
30. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P., Tanguy M. et al. // Blood. 2005. V. 106. № 5. P. 1843–1850.
31. Blomgran R., Ernst J. // J. Immunol. 2011. V. 186. № 12. P. 7110–7119.
32. Seiler P., Aichele P., Bandermann S., Hauser A., Lu B., Gerard N. et al. // Eur. J. Immunol. 2003. V. 33. № 10. P. 2676–2686.
33. Elsbach P., Weiss J. // Immunol. Lett. 1985. V. 11. P. 159–163.
34. Seiler P., Aichele P., Raupach B., Odermatt B., Steinhoff U., Kaufmann S. // J. Infec. Dis. 2000. V. 181. P. 671–680.
35. Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J.F., Delos M. et al. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005. V. 207. № 3. P. 221–231.

## Antibacterial and Immunomodulating Activity of Silver Nanoparticles on Mice Experimental Tuberculosis Model

O. V. Kalmantaeva<sup>a,\*</sup>, V. V. Firstova<sup>a</sup>, N. S. Grishchenko<sup>a</sup>, T. I. Rudnitskaya<sup>a</sup>,  
V. D. Potapov<sup>a</sup>, S. G. Ignatov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia  
\*e-mail: kalmantaevaov@yandex.ru

Received September 16, 2019; revised October 10, 2019; accepted November 1, 2019

In this study we have identified antibacterial activity of silver nanoparticles  $43.6 \pm 10.7$  nm against strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* (the studied concentrations of silver nanoparticles were 0.1; 1; 10; 25 и 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and in an experimental murine model of chronic tuberculosis. We have shown that silver nanoparticles at a concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  suppress the growth of mycobacteria *in vitro* by 2 times. Inhalation administration of silver nanoparticles at a dose of 0.1 mg/kg to tuberculosis-infected mice resulted in a two-fold decrease in the colonization of the lungs and spleens of *M. tuberculosis*. In these animals, the quantity of protein in the broncho-pulmonary lavage fluid was reduced two-fold to  $1908.5 \pm 105.7$  ( $P < 0.001$ ), which indicates a decrease in the inflammatory processes in the lungs; the level of production of reactive oxygen species by neutrophils increased, reflecting their bactericidal potential, which was reduced by 2.7 times before treatment compared to the control group of animals ( $P < 0.001$ ). After the introduction of silver nanoparticles, a recovery in the ratio of lymphocyte populations in the spleen and cytokine balance was observed, expressed in a decrease in the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 in blood serum and broncho-pulmonary lavage fluid in TB mice. Thus, for the first time it was shown that inhalation of silver nanoparticles stabilized with polyvinylpyrrolidone led not only to a noticeable bactericidal effect, but also recovered the balance of the immune system of mice.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, silver nanoparticles, lymphocytes, neutrophils, flow cytometry, cytokines, oxidative burst