

А.В. Захаров*¹, А.Л. Хохлов², А.Э. Эргешов³

¹ — ГБУЗ ЯО Областная клиническая туберкулёзная больница, Ярославль, Россия

² — ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ, кафедра клинической фармакологии с курсом института последипломного образования, Ярославль, Россия

³ — ФГБУ Центральный НИИ туберкулёза РАМН, Москва, Россия

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА

A.V. Zaharov*¹, A.L. Khokhlov², A.E. Ergeshov³

¹ — State Budgetary Healthcare Institution Yaroslavl region Regional Clinical TB Hospital, Yaroslavl, Russia

² — Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Yaroslavl State Medical University, Russian Federation Ministry of Health, Department of Clinical Pharmacology with course of Postgraduate Education Institute, Yaroslavl, Russia

³ — Federal State Budgetary Institution Central Research Institute of Tuberculosis Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

SILVER NANOPARTICLES IN THE SOLUTION OF THE PROBLEM OF DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Резюме

Цель — научное обоснование эффективности и безопасности применения НЧС в лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза. **Материалы и методы.** Использовали наночастицы серебра, полученные электрохимическим методом. С размером 5-60 нм, концентрацией— 120-270 в 1 мкм² и размером оболочки стабилизатора — 2-5 нм. На 750 посевах изучена подавляющая активность наночастиц серебра в изолированном варианте и в составе нанокompозита с химиопрепаратами в концентрациях 5; 25 и 50 мкг/мл. Определяли минимальную ингибирующую бактерицидную концентрации наночастиц в составе нанокompозита с изониазидом. Для оценки морфометрии МБТ использовали атомно-силовую микроскопию. Токсикологию нанопрепаратов изучали на 83 нелинейных белых мышах и 146 белых крысах. Химиотерапевтическую активность нанопрепаратов определяли на модели экспериментального туберкулёза у 65 белых мышах-самцах имбредной линии BALB/c. Инфицирующую дозу в количестве 5x10⁶ колониеобразующих единиц вводили в венозный синус глаза животного. Изониазид, наночастицы и нанокompозит начинали вводить через 14 дней после заражения внутримышечно ежедневно. Эффективность лечения определяли, сравнивая оценочные критерии в опытных и контрольных группах животных. Оценивали следующие показатели: индекс выживаемости, массу тела и коэффициент массы органов-мишеней, индекс поражения, индекс бактериоскопии и высеваемости из поражённых органов. Проводилось патоморфологическое исследование. **Результаты.** При использовании изониазида, к которому имела устойчивость возбудителя, с наночастицами серебра полное и значительное подавление роста МБТ наблюдалось в 49,2% наблюдений. При концентрации наночастиц 5 мкг/мл в составе композита бактерицидное действие достигало 91,3%. Минимальная подавляющая концентрация НЧС в сочетании с изониазидом составила 2,5 мкг/мл, минимальная бактерицидная — 5 мкг/мл. Отмечались изменения морфометрии МБТ под влиянием нанокompозита по данным атомно-силовой микроскопии. В изучаемых дозах изолированные НЧС не оказывают влияния на основные биометрические, лабораторные и функциональные параметры животных, а также, не повышают токсикологические параметры изониазида. Все изучаемые критерии эффективности лечения экспериментального туберкулёза имели достоверно приоритетные показатели при использовании нанокompозита. Патоморфологические исследования подтверждают полученные результаты. **Выводы.** Проведённое исследование даёт научное экспериментальное обоснование эффективности применения наночастиц серебра в комплексном лечении лекарственно-устойчивого туберкулёза. Наиболее эффективной дозировкой наночастиц серебра в составе композита при лечении экспериментального туберкулёза является 25 мкг/кг.

Ключевые слова: лекарственно-устойчивый туберкулёз, наночастицы серебра, лечение экспериментального туберкулёза

Для цитирования: Захаров А.В., Хохлов А.Л., Эргешов А.Э. НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА. Архив в внутренней медицины. 2017; 7(3): 188-199. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-3-188-199

Abstract

The goal — a scientific evaluation of the effectiveness and safety of NHS in the treatment of experimental drug-resistant tuberculosis. **Materials and methods.** Used silver nanoparticles obtained by an electrochemical method. With a size of 5-60 nm, 120-270 kontsentratsiyey- 1 mcm² and the size of

*Контакты/Contacts. E-mail: Yrzahan@mail.ru

the stabilizer shell — 2-5 nm. 750 crops studied Inhibitory activity of the silver nanoparticles in an isolated form and as part of a nanocomposite with chemotherapy in concentrations of 5; 25 and 50 mcg/ml. Defines the minimum inhibitory concentration of bactericidal nanoparticles composed of a nanocomposite with isoniazid. To evaluate the morphometry *M.tuberculosis* used atomic force microscopy. Toxicology nanopreparations studied 83 non-linear white mice and 146 white rats. Chemotherapeutic Activity nanopreparations determined on an experimental model of tuberculosis in 65 white male mice imbrednoy line BALB/c. Infectivity dose amount 5×10^6 colony forming units injected into the sinus venosus animal eyes. Isoniazid, nanoparticles and nanocomposite began administered 14 days after infection by intramuscular injection daily. Treatment efficacy was determined by comparing the evaluation criteria in the experimental and control groups of animals. Evaluated the following indicators: survival index, body mass index and weight of target organ, lesions index, index smear and inoculation of affected organs. Conducted pathological examination. **Results.** When using isoniazid, which had resistant pathogens, with silver nanoparticles full and significant inhibition of the growth of the *M.tuberculosis* observed in 49,2% of cases. When the concentration of the nanoparticles 5 mcg/ml in the composite bactericidal activity reached 91,3%. The minimum inhibitory concentration of silver nanoparticles in combination with isoniazid was 2,5 mcg/ml, the minimum bactericidal — 5 mcg /ml. There have been changes in the *M.tuberculosis* morphometry under the influence of the nanocomposite according to atomic force microscopy. In the studied doses of isolated silver nanoparticles do not affect the basic biometrics, laboratory and functional parameters of the animals, and do not increase the toxicological parameters of isoniazid. All criteria studied the effectiveness of treatment of experimental tuberculosis had significantly priority performance using nanocomposite. Pathological studies have confirmed these results. **Conclusions.** Of the study provides a scientific rationale for the effectiveness of the experimental use of silver nanoparticles in treatment of drug-resistant tuberculosis. The most effective dose of silver nanoparticles in the composite in the treatment of experimental tuberculosis is 25 mcg / kg.

Key words: drug-resistant TB, silver nanoparticles, treatment of experimental tuberculosis

For citation: Zaharov A.V. , Khokhlov A.L., Ergeshov A.E. SILVER NANOPARTICLES IN THE SOLUTION OF THE PROBLEM OF DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Archive of internal medicine. 2017; 7(3): 188-199. [In Russian]. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-3-188-199

DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-3-188-199

МЛУ — множественная лекарственная устойчивость, МБТ — микобактерии туберкулёза, НЧС — наночастицы серебра, ШЛУ — широкая лекарственная устойчивость

Введение

Несмотря на выдающиеся достижения во фтизиатрии, включая открытие возбудителя заболевания Р.Кохом в 1882 году и расшифровку генома МБТ в 1998 году, человечество перешагнуло в XXI век с бременем туберкулёза. Попытки победить инфекцию не увенчались успехом. Глобальную угрозу человечеству представляет нарастание множественной лекарственной устойчивости микобактерии туберкулёза (МЛУ-МБТ). По данным доклада ВОЗ о глобальной борьбе с туберкулёзом (2015), туберкулёз с МЛУ возбудителя в 2014 году имел место у 123 тыс. бактериовыделителей, в том числе, у 3,3% новых случаев туберкулёза и 20% случаев повторного лечения. По оценкам экспертов ВОЗ, 9,7% пациентов с МЛУ туберкулёзом (МЛУ ТБ) имеют широкую лекарственную устойчивость МБТ (ШЛУ-МБТ) [23]. Актуальной остаётся проблема туберкулёза и в России [7]. Всё чаще фтизиатры встречаются с тотальной устойчивостью МБТ к противотуберкулёзным препаратам. Ситуация в лечении туберкулёза во многих аспектах возвращается к началу прошлого века. Несмотря на значительный разброс эпидемиологических показателей в разных регионах мира, в целом, обстановка по заболеванию на планете продолжает оставаться напряжённой. ВОЗ констатирует, что туберкулёз остаётся одной из самых больших угроз в мире (2015). В 2014 году туберкулёз стал причиной смерти 1,5 миллионов человек. Ещё 400 тыс. погибли от этой инфекции на фоне заболевания ВИЧ [8]. За этот же период заболели туберкулёзом 9,6 миллиона человек, в том числе, 12% — лица, инфицированные ВИЧ.

По данным аналитических обзоров ВОЗ, более трети новых случаев туберкулёза и рецидивов в Европе приходится на долю Российской Федерации [23]. Терапия «скомпрометированными» по устойчивости химиопрепаратами не только малоэффективна, но и запускает механизмы морфофункционального дисбаланса лёгочной ткани, увеличивает токсические осложнения, способствует амплификации лекарственной резистентности.

Одним из направлений решения проблемы является поиск ингибиторов устойчивости, способных восстановить противотуберкулёзную активность ранее неэффективных химиопрепаратов. В качестве подобного агента нами предложено использовать наночастицы серебра (НЧС) [1, 2, 3, 4]. Наряду с выраженными биоцидными свойствами научными исследованиями установлена физиологическая роль серебра для поддержания нормального обмена веществ в организме человека и работы иммунной системы. Применение серебра в наноразмерном диапазоне позволяет использовать его в меньших концентрациях, при этом его биоцидные свойства увеличиваются кратно. [5, 6, 10]. На большом экспериментальном материале доказана бактерицидная активность НЧС в отношении лекарственно-устойчивых штаммов различных возбудителей [13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22]. Исследования по применению НЧС при туберкулёзе в литературе отсутствуют.

Целью исследования явилось научное обоснование эффективности и безопасности применения НЧС в лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза. В **задачи исследования**

входило: 1) *in vitro* изучить подавляющее действие изониазида с НЧС на лекарственно-устойчивые штаммы МБТ. Оценить подавляющее действие нанокompозита на МЛУ-МБТ с использованием атомно-силового микроскопа; 2) определить минимальные подавляющую и бактерицидную концентрации наночастиц в составе нанокompозита; 3) изучить общетоксические свойства нанокompозита; 4) изучить химиотерапевтическую эффективность нанокompозита «изониазид+НЧС» в лечении экспериментального туберкулёза у животных.

Материал и методы

НЧС получали электрохимическим методом в присутствии стабилизатора с цитратом аммония. Тестирование наночастиц проведено в центральной лаборатории электронной микроскопии Приволжского Федерального округа (г. Ярославль, протокол № 26 от 21.06.2010г.). Размер наночастиц серебра составлял 5-60 нм, концентрация — 120-270 в 1 мкм², размер оболочки стабилизатора — 2-5 нм.

Объём и структура исследования определялись соответствующими нормативными документами по изучению новых фармакологических веществ, действующими на момент исследования [12]. В эксперименте *in vitro* исследования проводились на 750 посевах лекарственно-устойчивых штаммов МБТ, выделенных в клинических условиях от больных туберкулёзом лёгких. Использовались плотные питательные среды Ливенштейна-Йенсена. Лекарственная устойчивость возбудителя тестировалась методом абсолютных концентраций. В изолированном варианте подавляющая активность наночастиц исследовалась на 99 посевах, в составе нанокompозита — на 651 посевах. Тестировались следующие концентрации наночастиц — 5; 25 и 50 мг/л. Оценка результатов исследования подавляющей активности проводилась на основании подсчета количества колоний образующих единиц (КОЕ) МБТ на плотной питательной среде и сравнения контрольных и опытных посевов.

Рост микобактерии оценивался по схеме:

«отсутствие роста» или «000» —
при полном отсутствии роста
«скудный» или «+» —
при росте от единичных до 20 колоний
«умеренный» или «++» —
при росте от 20 до 100 колоний
«обильный» или «+++» —
при росте более 100 колоний

Антибактериальную активность наночастиц серебра оценивали по способности подавлять рост лекарственно устойчивых штаммов микобактерий, которая рассчитывалась по соотношению количе-

ства КОЕ в контрольных и опытных образцах (контроль/опыт):

«+++»/«000»; «++»/«00»; «+»/«0» —
оценивали как полное подавление
«+++»/«+» —
оценивали как значительное подавление
«+++»/«++»; «++»/«+» —
оценивали как умеренное подавление
«+++»/«+++»; «++»/«++»; «+»/«+» —
оценивали как отсутствие подавления

В соответствии с рекомендациями по проведению доклинических исследований противотуберкулезной эффективности исследуемых препаратов при полном или значительном подавлении роста МБТ на средах в присутствии исследуемого фармакологического вещества, то есть при росте до 20 колоний, результат оценивали как бактерицидный. При умеренном подавлении роста эффективность действия вещества оценивали как бактериостатический [12]. В отдельном эксперименте определяли минимальную ингибирующую концентрацию и минимальную бактерицидную концентрацию НЧС в составе нанокompозита с изониазидом.

Морфометрические параметры МБТ до и после воздействия исследуемых препаратов изучали с помощью атомно-силового микроскопа Femto-Скан производства НПП «Центр перспективных технологий» (Москва). Для обработки изображения использовалась программа FemtoScan [17].

Изучение токсикологических свойств наночастиц и нанокompозита проводилось на 83 нелинейных белых мышах и 146 белых крысах в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава РФ [9].

Исследования химиотерапевтической активности нанопрепаратов *in vivo* проводилось на 65 белых мышах-самцах имбредной линии BALB/c. Модель экспериментального туберкулёза у мышей создавалась введением возбудителя, полученного от больных резистентным туберкулёзом, в венозный синус глаза животного. Инфицирующая доза для животных составляла 5×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ). Клинический штамм МБТ проявлял устойчивость к изониазиду (1 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (25 мкг/мл). Наблюдаемые группы животных представлены в *табл. 1*. Развитие туберкулёзного процесса у животных, кроме оценки общего состояния, верифицировалось патоморфологическими методами с макроскопическими и микробиологическими исследованиями. Изучаемые препараты начинали вводить животным через 14 дней после заражения.

Изониазид, наночастицы и нанокompозит вводили лабораторным животным внутримышечно ежеднев-

Таблица 1. Группы экспериментальных животных
Table 1. Experimental Animal Groups

№ группы/ Group number	Характеристика, препарат, доза/ Characteristics, a drug, dose	Количество животных/ Number of animals
Контрольные группы/Control groups		
1	Незаражённые/Uninfected	5
2	Без лечения/ Without treatment	10
3	Изониазид 50мг/кг/ Isoniazid 50 mg / kg	10
Опытные группы/Experienced groups		
Наночастицы серебра/ Silver nanoparticles		
4-а	12,5 мкг/кг	5
4-б	25,0 мкг/кг	5
4-в	50,0 мкг/кг	5
4-г	125,0 мкг/кг	5
Изониазид 50мг/кг + Наночастицы серебра/ Isoniazid 50 mg/kg + Silver nanoparticles		
5-а	12,5 мкг/кг	5
5-б	25,0 мкг/кг	5
5-в	50,0 мкг/кг	5
5-г	125,0 мкг/кг	5

но, чередуя конечности. Наноккомпозит готовили непосредственно перед применением, смешивая в шприце химиопрепарат и наночастицы в дозах, указанных в табл. 1. Эффективность лечения определяли, сравнивая оценочные критерии в опытных и контрольных группах животных. Изучали динамику следующих показателей: индекс выживаемости, массу тела и коэффициент массы органов-мишеней (лёгкие, печень, селезёнка), индекс поражения паренхиматозных органов, индекс бактериоскопии и высеваемости из поражённых органов (лёгкие, печень, почки, селезёнка). Определяли важнейшие биохими-

ческие параметры животных [11]. Проводилось патоморфологическое исследование органов-мишеней.

При статистической обработке материала рассчитывали среднее значение показателя и величину средней ошибки. Статистическую достоверность показателей оценивали с помощью коэффициента достоверности 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 и обсуждение

ОЦЕНКА ПОДАВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МБТ IN VITRO

При исследовании подавление роста микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью НЧС в концентрациях 5, 25 и 50 мкг/мл было установлено полное и значительное подавление роста в 35,4% случаев (табл. 2). Умеренное подавление наблюдалось у 26,3% изолятов микобактерий туберкулеза. Полученные результаты исследования свидетельствуют о подавляющей активности наночастиц в отношении МБТ.

Из табл. 2 следует, что наиболее предпочтительной концентрацией наночастиц серебра, демонстрирующей максимальный подавляющий эффект, была концентрация 5 мкг/мл. Полное и значительное подавление роста резистентного возбудителя наблюдалось при концентрации 5 мкг/мл соответственно в 42,4%±13,7% и 36,4%±14,5% случаев. Результативность подавляющего действия других концентраций

Таблица 2. Подавление роста МЛУ-МБТ НЧС в разных концентрациях
Table 2. Growth inhibition of MDR-M. tuberculosis silver nanoparticles at various concentrations

Подавление роста контроль/опыт/ Growth Suppression control/experience	Концентрация наночастиц серебра (мкг/мл)/ The concentration of silver nanoparticles (µg / ml)			
	5	25	50	Всего
Полное/Total «+++»/«000»	14	4	2	20
%	42,4±13,7	12,1±18,8	6,1±23,8	20,2±9,2
Значительное/Significant «+++»/«+»	12	3	0	15
%	36,4±14,5	9,1±20,3	0,0	15,2±9,5
Умеренное/Moderate «+++»/«++»	4	19	3	26
%	12,1±18,8	57,6±11,6	9,1±20,3	26,3±8,8
Отсутствует/Missing «+++»/«+++»	3	7	28	38
%	9,1±20,3	21,2±16,6	84,8±6,9	38,4±7,8
Всего/Total	33	33	33	99
%	100,0	100,0	100,0	100,0

наносеребра была менее выражена (рис. 1). Как следует из данных, представленных на рис. 1, полное и значительное подавление роста (бактерицидное действие) МБТ наблюдалось при концентрации наночастиц 25 мкг/мл соответственно в $12,1\pm 18,8\%$ и $9,1\pm 20,3\%$ случаев, при концентрации 50 мкг/мл в $6,1\pm 23,8\%$ случаев. При концентрации 25 мкг/мл преобладало бактериостатическое действие НЧС, наблюдаемое по умеренному подавлению роста микобактерий в $57,6\pm 11,6\%$ случаев.

Концентрация раствора с содержанием наночастиц 50 мкг/мл оказалась менее эффективной по бактерицидному и бактериостатическому действию. Отсутствии эффекта наблюдалось в $84,8\pm 6,9\%$ случаев. Таким образом, полученные в эксперименте *in vitro* данные позволяют обосновать подавляющее действие НЧС в отношении лекарственно-устойчивых штаммов МБТ. Наиболее эффективной по бактерицидному действию оказалась концентрация наноча-

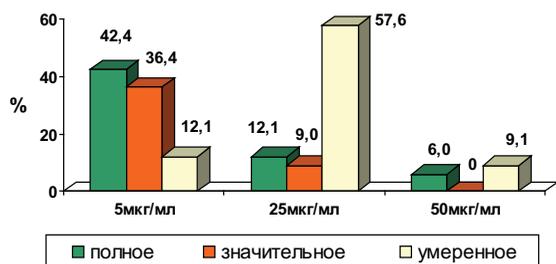


Рисунок 1. Подавление роста МБТ с ЛУ НЧС в разных концентрациях

Figure 1. Growth inhibition of DR-M. tuberculosis silver nanoparticles at various concentrations

стиц 5 мкг/мл, которая обеспечила подавление и значительное уменьшение роста МБТ в 78,8% случаев.

В табл. 3 представлены результаты исследований подавляющей активности НЧС различной концентрации в комбинации с химиопрепаратами. Полное и значительное подавление роста МЛУ возбудителя отмечалось соответственно в 145 ($22,3\pm 3,4$) и 175 ($26,9\pm 3,3$) наблюдениях из 651 (100%). Максимальная подавляющая активность наблюдалась при концентрации наночастиц 5 мкг/мл. Полное и значительное подавление роста мультирезистентных штаммов возбудителя наблюдалось при данной концентрации в 91,2% случаев. При концентрациях 25 мкг/мл и 50 мкг/мл подавляющий эффект был менее выражен.

Полученные в эксперименте *in vitro* данные позволяют заключить, что НЧС оказывают подавляющее действие на МБТ в изолированном режиме и потенцируют действие химиопрепаратов по преодолению лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Наибольшая результативность подавления роста возбудителя достигнута при совместном применении наночастиц и химиопрепарата, что свидетельствует о возможности восстановления противотуберкулезной активности препарата. Наиболее оптимальной концентрацией наночастиц, позволяющей достигать максимального подавляющего эффекта на рост лекарственно-устойчивого возбудителя является 5 мкг/мл. Исследованиями установлено, что минимальная подавляющая концентрация НЧС в сочетании с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл на МЛУ штаммы МБТ составляет 2,5 мкг/мл. Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц при тех же параметрах изониазида составила 5 мкг/мл.

Таблица 3. Подавление роста МЛУ-МБТ при разных концентрациях НЧС в комбинации с химиопрепаратами
Table 3. Growth inhibition of MDR-M. tuberculosis silver nanoparticles at various concentrations in combination with chemotherapy

Подавление роста контроль/опыт/ Growth Suppression control/experience	Концентрация НЧС в комбинации химиопрепаратами (мкг/мл)/ Concentration of silver nanoparticles in combination with chemotherapy ($\mu\text{g} / \text{ml}$)			
	5	25	50	Всего
Полное/Total «+++»/«000»	108	35	4	145
%	$49,8\pm 4,8$	$15,2\pm 6,2$	$1,8\pm 6,7$	$22,3\pm 3,4$
Значительное/Significant «+++»/«+»	90	56	29	175
%	$41,5\pm 5,1$	$25,8\pm 5,8$	$13,4\pm 6,4$	$26,9\pm 3,3$
Умеренное/Moderate «+++»/«++»	6	89	75	170
%	$2,8\pm 7,3$	$41,0\pm 5,2$	$34,6\pm 5,4$	$26,1\pm 3,3$
Отсутствует/Missing «+++»/«+++»	13	39	109	161
%	$6,0\pm 6,8$	$18,0\pm 6,1$	$50,2\pm 4,7$	$24,7\pm 3,4$
Всего/Total	217	217	217	651
%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЧС

Одним из главных условий применения исследуемого агента в качестве химиотерапевтического средства является определение параметров его безопасного использования. Известно, что токсичность нанообъектов может быть выше, чем их аналогов в макроформе. Это связано с повышенными физико-химическими свойствами наночастиц, позволяющими им проникать через биологические барьеры и взаимодействовать с клеточными структурами, включая хромосомный аппарат [24]. Наряду с оценкой общей токсичности НЧС определялась возможность их влияния на токсичность изониазида, входящего в состав нанокompозита. Результаты изучения острой, субхронической и хронической токсичности показали, что в изучаемых дозах изолированные наночастицы не оказывают влияния на основные биометрические, лабораторные и функциональные параметры животных. Результаты гистологического исследования органов-мишеней также не выявили структурных, воспалительных и дистрофических изменений (рис. 2,3).

При макроскопической оценке внутренних органов животных контрольной группы и крыс, получавших нанокompозит на протяжении 7 месяцев, во время вскрытия не было выявлено каких-либо особенностей. Важно отметить, что НЧС в изучаемых дозах не оказали влияния на известные токсикологические показатели изониазида. При внутрибрюшинном введении нанокompозита ЛД₅₀ для мышей составила 200 мг/кг по изониазиду, для крыс — 300 мг/кг, при внутривенном — 200 мг/кг для обоих видов животных, что согласуется с данными литературы [4]. В ходе токсикологического эксперимента получены результаты, позволяющие предположить лимфостимулирующее и гемореологическое действие наночастиц серебра, что может иметь существенное патогенетическое значение в терапии туберкулеза.

Для оценки морфометрических изменений МБТ, происходящих под влиянием нанокompозита были проведены исследования возбудителя с использованием атомно-силового микроскопа. Было изучено 25 образцов МЛУ-МБТ, в том числе — 5 образцов подвергались воздействию изониазида в концентрации 1 мкг/мл, 10 образцов — НЧС в концентрации 10 мкг/мл и 10 образцов — нанокompозитом в концентрациях: по изониазиду — 1 мкг/мл, по наночастицам — 5 мкг/мл.

На рис. 4 показана МБТ после 24 часовой экспозиции с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл. Возбудитель имеет вытянутую форму в виде палочки с размерами: длина — 2,5-3 мкм; ширина — 0,5 мкм. Отсутствие видимых изменений морфологии возбудителя свидетельствует об устойчивости к химиопрепарату. *M.tuberculosis*, подвергнутая 24 часовой экспозиции нанокompозитом в составе изониазида

(1 мкг/мл) и НЧС (5 мкг/мл), представлена на рис. 5. На снимке визуализируется продольное вдавление бактериальной стенки, что отражает снижение внутреннего упругого напряжения клетки с нарушением исходных параметров МБТ. При экспозиции МБТ в растворе изолированных наночастиц серебра в концентрации 5 мкг/мл мы не выявили существенных морфометрических изменений возбудителя.

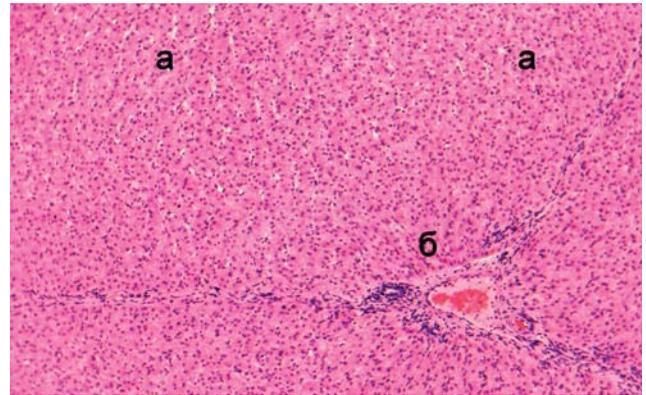


Рисунок 2. Печень крысы (возраст 9 мес.) через 7 месяцев после заправки нанокompозитом. Пластинки гепатоцитов (а), печёночные дольки и триады (б) — без признаков патологии. Окраска гематоксилин-эозином, ув. × 400 (об.40, к.10).

Figure 2. Rat liver (age 9 months) 7 months after seeding nanocomposite. Plates hepatocytes (a) and hepatic lobules triad (b) — no signs of pathology. Stained with hematoxylin-eosin, enlargement × 400.

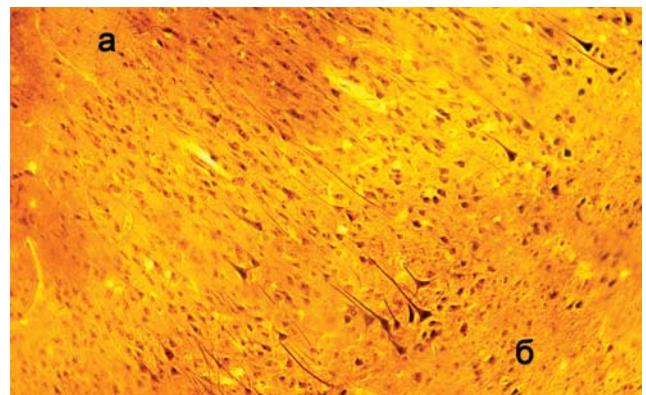


Рисунок 3. Кора головного мозга белой крысы (возраст 9 мес.) через 7 месяцев после заправки нанокompозитом: а — серое вещество, б — белое вещество. В сером веществе цито- и миеоархитектоника не нарушены. Полнокровия кровеносных сосудов не выявлено. Импрегнация азотнокислым серебром, ув. ×400 (об.40, ок.10).

Figure 3. The cerebral cortex of white rats (age 9 months.) 7 months after seeding nanocomposite: a — the gray matter, b — a white substance. The gray matter of the cyto- and myeloarhitektonika not broken. Bloodstroke vessels have been identified. Impregnated with silver nitrate, enlargement × 400.

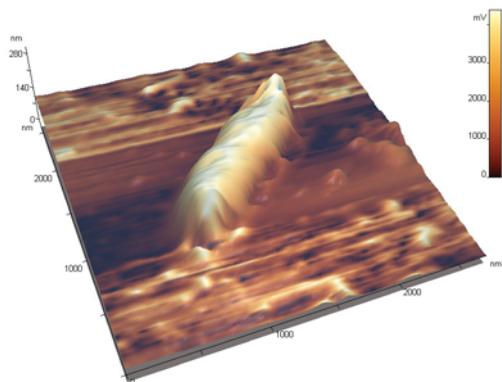


Рисунок 4. Атомно-силовая микроскопия МЛУ-МБТ после 24-часовой экспозиции с изониазидом 1мкг/мл
Figure 4. Atomic force mikroskopiya MDR-M.tuberculosis after 24-hour exposure with isoniazid 1mcg/ml

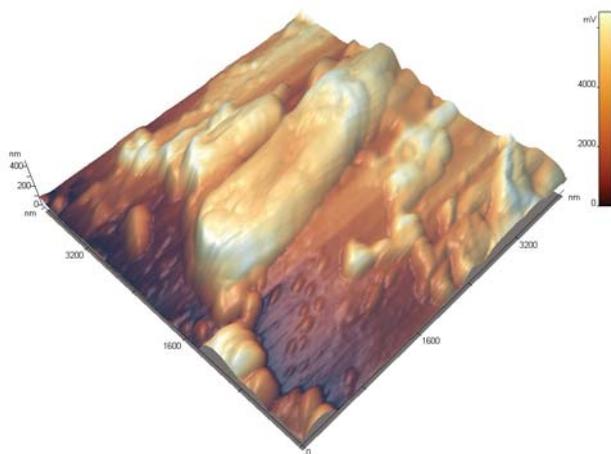


Рисунок 5. МЛУ-МБТ после 24 часовой экспозиции в изониазиде 1мкг/мл с НЧС в концентрации 5 мкг/мл
Figure 5. MDR-M.tuberculosis after 24 hour exposure to isoniazid 1 mcg/ml with silver nanoparticles 5 mcg/ml

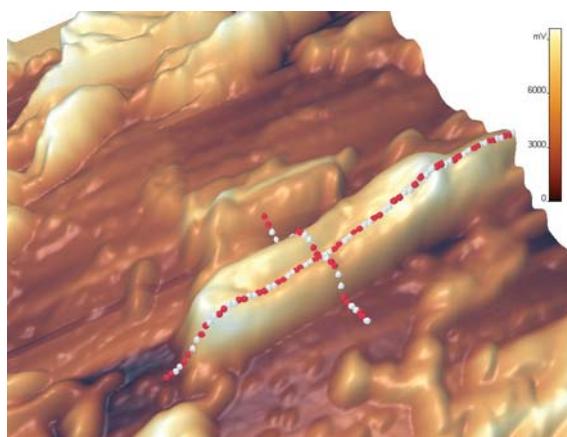


Рисунок 6. Профиль повреждённой нанокompозитом МЛУ МБТ
Figure 6. Cross-section damaged nanocomposite MDR-M.tuberculosis

Таким образом, по данным атомно-силовой микроскопии, воздействие НЧС в сочетании с изониазидом на МЛУ-МБТ сопровождается изменением морфометрических параметров возбудителя с формированием М-образного поперечного профиля МБТ (рис. 6). Полученные при атомно-силовой микроскопии данные могут свидетельствовать о синергидном действии наночастиц и химиопрепарата по преодолению лекарственной устойчивости возбудителя.

ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Выживаемость животных в эксперименте in vivo является интегральным критерием эффективности лечения. Выживаемость в экспериментальных группах фиксировали на момент 100% гибели группы не леченых животных (табл. 4). Как показали исследования, наиболее высокий индекс выживаемости (90%) наблюдался при использовании в лечении комбинации наночастиц с изониазидом. При этом проявился дозозависимый характер потенцирующего действия наночастиц на химиопрепарат. Максимальная активность нанокompозита со 100% выживаемостью животных отмечалась при дозах наночастиц в составе препарата 12,5 мкг/кг и 25 мкг/кг.

Применение наночастиц серебра в изолированном режиме обеспечило выживание к концу эксперимента 7 животных из 20 (35%). В этой группе мышей также отмечалась наибольшая эффективность при дозах наносеребра 12,5 мкг/кг и 25 мкг/кг. При лечении изониазидом в монорежиме в дозе 50мг/кг выжили 4 особи из 10 (индекс выживаемости 40%). Таким образом, максимальная выживаемость наблюдалась у животных, в лечении которых использовался нанокompозит с содержанием наночастиц серебра в дозах 12,5 мкг/кг и 25 мкг/кг.

Важным критерием, отражающим эффективность лечения, является показатель массы тела животных. Полученные в ходе исследования результаты динамики массы тела экспериментальных мышей представлены в диаграмме на рис. 7.

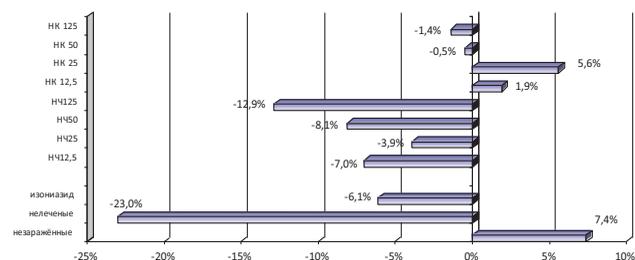


Рисунок 7. Диаграмма изменения массы тела мышей к исходной массе
Figure 7. Figure mice body weight changes to the stock

Как видно из диаграммы, положительную динамику массы к окончанию эксперимента имели животные в трёх группах — незараженные (+7,4%) и леченые наноконкомпозитом с содержанием наночастиц в дозах 12,5 мкг/кг (+1,9%) и 25 мкг/кг (+5,6%). При лечении изониазидом наблюдалась отрицательная динамика массы тела к исходной (-6,1%). Таким образом, по критерию динамики массы тела максимальная эффективность лечения зафиксирована при использовании изониазида в комбинации с НЧС в дозе 25 мкг/кг — +5,6% ($p < 0,05$).

Достаточно информативным критерием эффективности лечения является коэффициент массы органа-мишени, рассчитываемый как отношение массы органа к массе тела. На фоне нарастания воспалитель-

ных изменений в органе его масса увеличивается, а преобладание катаболических процессов в организме сопровождается снижением массы тела. Следовательно, при прогрессировании заболевания, коэффициент массы органа увеличивается, и наоборот, при эффективном лечении — снижается. Коэффициент массы лёгких отражает распространённость специфического поражения лёгочной ткани, селезёнки — тяжесть течения инфекции и степень генерализации процесса, коэффициент массы печени свидетельствует о степени интоксикации животного.

Результаты биометрических исследований, представленные в табл. 5, статистически достоверно подтверждают приоритет наноконкомпозита по эффективности лечения экспериментального туберкулёза.

Таблица 4. Выживаемость экспериментальных животных
Table 4. The survival of experimental animals

№ группы/ Group number	Кол-во мышей/ Number of mice	Погибло животных в ходе эксперимента/ Animals died during the experiment							Всего погибло/ Total deaths	Всего выжили/ Total survived	Индекс Выживаемости/ Survival index
		Сроки после начала лечения/ Terms after the beginning of treatment									
		10 дней 10 days	20 дней	25 дней	30 дней	35 дней	40 дней	45 дней			
Контрольные группы/Control groups											
1	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
2	10	---	---	---	2	6	1	1	10	0	0%
3	10	---	---	---	---	3	3	---	6	4	40%
Заражённые, леченые наночастицами серебра/Infected animals treated with silver nanoparticles											
4-а	5	---	---	---	1	1	1	---	3	2	40%
4-б	5	---	---	---	---	---	2	---	2	3	60%
4-в	5	---	---	---	2	1	---	---	3	2	40%
4-г	5	---	---	---	1	3	1	---	5	0	0%
Всего:	20	---	---	---	4	5	4	---	13	7	35%
Заражённые, леченые наночастицами серебра и изониазидом/Infected animals treated with silver nanoparticles + Isoniazid											
5-а	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
5-б	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
5-в	5	---	---	---	---	---	---	1	1	4	80%
5-г	5	---	---	---	---	---	1	---	1	4	80%
Всего:	20	---	---	---	---	---	1	1	2	18	90%

Таблица 5. Итоговые результаты биометрических исследований
Table 5. Summary of biometric research

№ гр./ Group number	Условия опыта/ Terms of Experience	Индекс Поражения/ Index of defeat	Коэффициент массы лёгких/ Coefficient of mass of the lungs	Коэффициент массы селезенки/ Coefficient of mass of the spleen	Коэффициент массы печени/ Coefficient of liver mass
1	Без лечения/Without treatment	2,7±0,67	6,11±0,65	4,04±0,35	10,03±0,66
2	Изониазид/Isoniazid 50 мг/кг	2,0±0,82	4,36±0,45 P1-2 <0,05	2,68±0,41 P1-2 <0,05	7,22±0,42 P1-2 <0,05
3	Наночастицы Серебра/ Silver nanoparticles	1,95±0,69 P1-3 <0,05	5,0±0,79 P1-3 <0,05	3,03±0,28 P1-3 <0,05	7,62±0,47 P1-3 <0,05
4	Наноконкомпозит/ Nanocomposite	0,6±0,68 P1-4 <0,001 P2-4 <0,001 P3-4 <0,001	2,71±0,24 P1-4 <0,001 P2-4 <0,001 P3-4 <0,001	2,2±0,19 P1-4 <0,001 P3-4 <0,05	6,61±0,33 P1-4 <0,001 P3-4 <0,05

Таким образом, эффективность применения нанокомпозита в лечении экспериментального туберкулёза отражается в ограничении распространённости специфического поражения лёгких, уменьшении тяжести и степени генерализации инфекции, а также степени интоксикации.

На *рис. 8* представлены результаты высеваемости культуры *M.tuberculosis* из органов экспериментальных животных. Наименьшая высеваемость из лёгочной ткани наблюдалась в группе мышей,

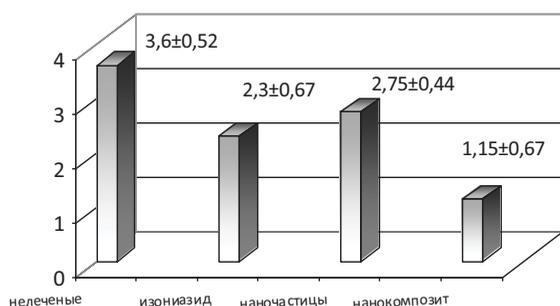


Рисунок 8. Диаграмма индексов высеваемости МБТ из лёгочной ткани животных при разных режимах лечения (ус.ед)

Figure 8. Chart indexes inoculation *M.tuberculosis* of lung tissue of animals with different treatment regimens (us.ed)

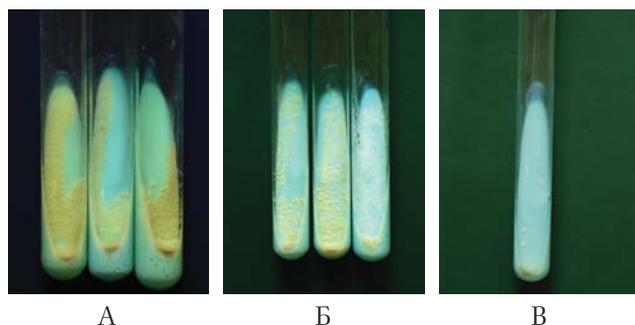


Рисунок 9. Высеваемость из лёгочной ткани животных А – нелеченые, Б – лечение изониазидом, В – лечение нанокомпозитом

Figure 9. Inoculation of lung tissue of animals А – untreated, В – treated with isoniazid, В – treated nanocomposite

получавших лечение НЧС в сочетании с изониазидом. Индекс высеваемости в этой группе составил $1,15 \pm 0,67$ ус.ед. против $3,6 \pm 0,52$ у не леченых животных ($p < 0,001$), $2,30 \pm 0,67$ — получавших изониазид ($p < 0,05$) и $2,75 \pm 0,44$ — при лечении НЧС в изолированном режиме ($p < 0,05$).

Таким образом, эффективность применения нанокомпозита в лечении экспериментального туберкулёза по индексу высеваемости из лёгочной ткани превосходила результаты применения изолированного изониазида, в два раза, изолированных наночастиц — в 2,4 раза. На *рис. 9* представлены результаты высеваемости из лёгочной ткани животных при различных режимах лечения.

Результаты высеваемости МБТ из экстраторакальных органов представлены в *табл. 6*. Как следует из *табл. 6*, индекс высеваемости из органов-мишеней при использовании нанокомпозита имел наименьшие значения, что свидетельствует о большей эффективности лечения. При этом разница показателей, полученных при лечении нанокомпозитом имела статистическую достоверность в сравнении с результатами при других режимах лечения ($p < 0,05$).

Одним из основных объективных критериев эффективности лечения является патоморфологическая оценка поражённых органов, в первую очередь — лёгочной ткани. В *табл. 7* даётся оценка характера и распространённости специфических изменений в лёгочной ткани у животных разных экспериментальных групп по итогам лечения. Проведённый анализ результатов, представленных в *табл. 7* позволяет заключить, что гистологическая картина лёгких при использовании в лечении нанокомпозита была наиболее предпочтительной.

На *рис. 10* представлены результаты гистологического исследования лёгких животных при разных режимах лечения. У животных, не получавших лечения (А, 2 гр.), в лёгочной ткани определялось значительное количество инфильтративных изменений. Сливной характер инфильтрации наблюдался у 9 (90%) животных (*табл. 7*). У всех мышей отмечалось выраженное снижение воздушности лёгочной ткани. В альвеолах определялись явления серозной и фибринозной экссудации. В периваскулярной

Таблица 6. Результаты высеваемости возбудителя из органов-мишеней
Table 6. Results of the pathogen inoculation of target organs

№ гр./ Group number	Условия опыта/ Terms of Experience	Высеваемость (ус. ед.)/Detection rate		
		Печень/Liver	Почки/Kidneys	Селезёнка/Spleen
1	Без лечения/Without treatment	2,6±0,97	2,7±0,67	0,9±0,74
2	Изониазид/ Isoniazid	1,7±0,82	1,2±0,92	0,6±0,70
3	Наночастицы/ Silver nanoparticles	2,0±0,73	1,25±0,55	0,65±0,49
4	Нанокомпозит/ Nanocomposite	0,55±0,51	0,2±0,41	0,15±0,37

Таблица 7. Характер и распространённость специфического поражения лёгочной ткани
Table 7. The nature and prevalence of specific destruction of lung tissue

№ Группы/ Group number	Сливной характер инфильтрации/ Confluent character of infiltration	Очаговый характер инфильтрации/ Focal character of infiltration	Выраженное снижение воздушности/ Pronounced decrease in airiness	Множественные Гранулёмы/ Multiple granulomas	Отдельные гранулёмы/ Individual granulomas
1	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm
2	9	1	10	---	---
3	6	4	6	---	3
4	12	8	15	---	6
5	4	16	6	9	7

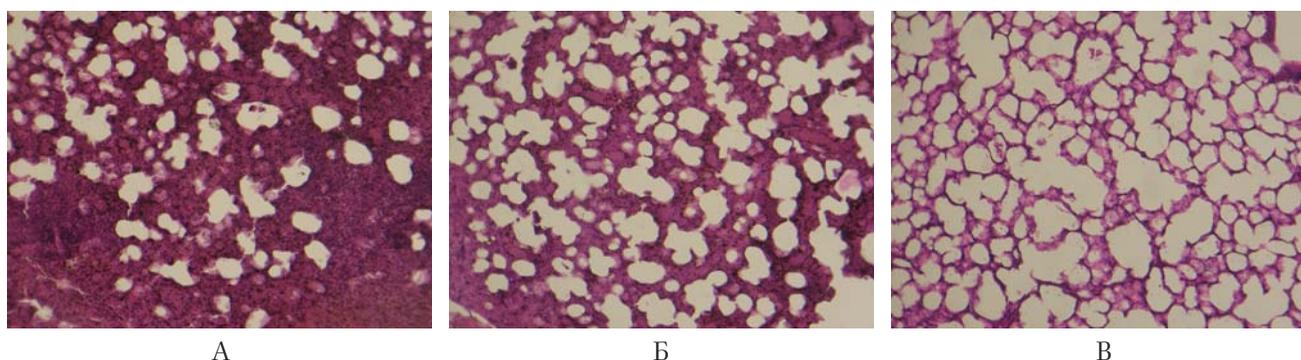


Рисунок 10. Патоморфологическая картина лёгочной ткани мышей, не получавших лечения (А), при лечении изониазидом (Б), при лечении нанокompозитом (В).
Figure 10. Pathological pattern of lung tissue of mice that did not receive treatment (A) with isoniazid treatment (B) in the treatment of nanocomposite (B).

Таблица 8. Клеточный состав инфильтратов и гранулём
Table 8. The cellular composition infiltrates and granulomas

Группа/ Group	Единичные нейтрофилы/ Single neutrophils	Скопления нейтрофилов/ Accumulations of Neutrophil	Скопления эпителиоидных клеток/ Accumulations of Epithelioid cells	Лимфоидные гранулёмы/ Lymphoid granulomas	Эпителиоидные гранулёмы/ Epithelioid granulomas
1	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm	Норма/Norm
2	1	9	4	---	---
3	6	4	6	2	1
4	14	6	8	4	2
5	2	---	2	5	11

зоне фиксировались крупные лимфогистиоцитарные инфильтраты. В тоже время, перибронхиальные отделы были свободны от лимфогистиоцитарных скоплений. В составе инфильтратов наблюдались лимфоциты, эпителиоидные клетки, крупные макрофаги (клетки типа Пирогова-Лангханса), нейтрофильные гранулоциты.

В подавляющем большинстве случаев (у 9 животных из 10) отмечались выраженные скопления нейтрофильных лейкоцитов с формированием детрита и участков казеозного некроза (табл. 8). Наличие нейтрофильных гранулоцитов свидетельствовало о превалировании альтеративных воспалительных изменений с прогрессированием специфического туберкулёзного процесса.

Использование в лечении изониазида (Б, 3 гр.) способствовало некоторому уменьшению распространённости специфического воспаления. Зоны инфильтративных изменений имели тенденцию к фрагментации и располагались отдельными очагами, расположенными чаще периваскулярно и перибронхиально. Сливные инфильтративные изменения наблюдались в этой группе у 6 мышей (60%), у 4 (40%) животных инфильтрация имела очаговый характер с относительно чёткими границами, при этом лимфоциты располагались вокруг единичных эпителиоидных клеток или их скоплений. Таким образом, намечалось формирование лимфоидно-клеточных и эпителиоидно — клеточных гранулём. Лимфоидные гранулёмы отмечены у 2 животных (20%), эпителиоидные — у 1 (10%) (табл. 8). В зонах

специфической инфильтрации альвеолы и межальвеолярные перегородки были инфильтрованы лимфоцитами, клетками Пирогова — Лангханса, эпителиоидными клетками и их скоплениями. Таким образом, несмотря на лекарственную устойчивость возбудителя, использование изониазида в лечении экспериментальных животных данной группы способствовало некоторому снижению интенсивности воспалительных изменений.

В 5 опытной группе (рис. 10 В) применение нанокompозита способствовало уменьшению распространённости специфических воспалительных изменений в лёгочной ткани животных. Выраженное снижение воздушности лёгочной ткани отмечалось у 6 животных (30%). Сливные инфильтративные изменения зафиксированы у 1 мыши (5%), у 7 животных инфильтрация носила крупно- и среднеочаговый характер, у 12 — мелкоочаговый. В 9 случаях наблюдались множественные гранулёмы, у 7 животных — отдельные гранулёмы (табл. 7). Нейтрофильные гранулоциты у животных этой группы в гистологических препаратах не встречались. В гранулёмах в значительном количестве наблюдались макрофагально-эпителиоидные элементы, клетки типа Пирогова-Лангханса. Эпителиоидные гранулёмы при лечении наблюдались у 11 животных (55%), лимфоидные — у 5 (25%) (табл. 8). Преобладание эпителиоидных клеток, многоядерных гигантских клеток Пирогова-Лангханса отражает преимущественно продуктивный тип тканевой реакции и свидетельствует о положительной динамике течения воспалительного процесса. Таким образом, результаты гистологического исследования подтверждают приоритет использования в лечении резистентного туберкулёза НЧС в комбинации с изониазидом.

Выводы

1. При изучении *in vitro* подавляющей активности НЧС в комбинации с изониазидом, к которому имелась лекарственная устойчивость МБТ, было установлено, что полное и значительное подавление роста возбудителя отмечалось в 49,2% наблюдений. Установлено, что при концентрации наночастиц 5 мкг/мл бактерицидное действие достигало в 91,3%. По данным атомно-силовой микроскопии экспозиция резистентной МБТ в растворе НЧС с изониазидом приводит к деформации клеточной стенки, что может свидетельствовать о потенцировании химиопрепарата наночастицами по преодолению лекарственной устойчивости возбудителя.

2. Как показали исследования, минимальная подавляющая концентрация НЧС в сочетании с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл на мультирезистентные штаммы возбудителя туберкулёза составляет 2,5 мкг/мл, а минимальная бактерицидная — 5 мкг/мл.

3. Результаты изучения острой, субхронической и хронической токсичности показали, что в изучаемых дозах изолированные НЧС не оказывают влияния на основные биометрические, лабораторные и функциональные параметры животных, а также, не повышают токсикологические параметры изониазида.

4. Исследование эффективности применения нанокompозита в лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза по результатам всех изучаемых критериев доказывает потенцирующее действие наночастиц на изониазид по преодолению лекарственной устойчивости возбудителя. Полученные результаты показывают, что оптимальная дозировка наночастиц в составе композита составляет 25 мкг/кг массы животного. Результаты патоморфологического исследования подчеркивают приоритет в лечении экспериментального туберкулёза нанокompозита.

Конфликт интересов/Conflict of interests

Авторы заявляют, что данная работа, её тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов/The authors state that this work, its theme, subject and content do not affect competing interests

Список литературы / References:

- Захаров А.В., Кибрик Б.С., Павлов А.В. Эффективность лечения экспериментального туберкулёза с использованием наночастиц серебра. Туберкулёз и болезни лёгких. 2011; 4: 151-152. Zakharov A.V., Kibrik B.S., Pavlov A.V. The effectiveness of treatment of experimental tuberculosis with silver nanoparticles. Tuberculosis and lung diseases. 2011; 4: 151-152 [in Russian].
- Кибрик Б.С., Павлов А.В., Захаров А.В. и др. Экспериментальное обоснование преодоления резистентности возбудителя туберкулёза нанокompозитом изониазида и наночастиц серебра. Экспер. и клинич. Фармакология. 2011; 74(4): 24-26. Kibrik B.S., Pavlov A.V., Zakharov A.V. et al. Experimental substantiation of overcoming the resistance of the pathogen of tuberculosis nanocomposite of isoniazid and silver nanoparticles. Exper. and clinical. Pharmacology. 2011; 74(4): 24-26 [in Russian].
- Кибрик Б.С., Павлов А.В., Захаров А.В. и др. Новые подходы к лечению больных туберкулёзом с лекарственной устойчивостью возбудителя с использованием наночастиц серебра. Туберкулёз и болезни лёгких. 2011; 11: 37-41. Kibrik B.S., Pavlov A.V., Zakharov A.V. et al. New approaches to the treatment of TB patients with drug-resistant with the use of silver nanoparticles. Tuberculosis and lung diseases. 2011; 11: 37-41 [in Russian].
- Кибрик Б.С., Павлов А.В., Захаров А.В. и др. Токсикологическая оценка нанокompозита для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза. Токсикологический вестник. 2012; 3: 28-33. Kibrik B.S., Pavlov A.V., Zakharov A.V. et al. Toxicological evaluation of nanocomposite for the treatment of drug-resistant tuberculosis. Poison Gazette. 2012; 3: 28-33 [in Russian].
- Малафеева Э.В., Хохлов А.А., Хохлов А.Л. и др. Антимикробная и токсикологическая характеристика антибактериальной мази с наночастицами серебра. Ремедиум. 2011; 4: 96-97.

- Malafeeva E.V., Khokhlov A.A., Khokhlov A.L. et al. Antimicrobial and toxicological characterization of antibiotic ointment with silver nanoparticles. *Remedium*. 2011; 4: 96-97 [in Russian].
6. Муха Ю.П., Еременко А.М., Смирнова Н.П. и др. Антимикробная активность стабильных наночастиц серебра заданного размера. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2013; 49(2): 215. Mucha J.P., Eremenko A.M., Smirnova N.P. et al. Antimicrobial activity of stable nanoparticles of a given size silver. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013; 49(2): 215 [in Russian].
 7. Габбасова Л.А., Касаева Т.Ч., Стерликов С.А. и др. Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2014–2015 г.г. Аналитический обзор основных показателей и статистические материалы. М.: РИО ЦНИИОИЗ, 2016. 89 с. Gabbasova L.A., Kasaeva T.Ch., Sterlikov S.A. et al. Industry and economic indicators of TB work in 2014–2015. Analytical review of key indicators and statistical material. M.: RIO FPHI, 2016. 89 p. [in Russian].
 8. Пантелеев А.М. Туберкулёз с лекарственной устойчивостью МБТ у больных ВИЧ-инфекцией. В сб. Актуальные проблемы и перспективы развития противотуберкулёзной службы в российской Федерации: Матер. 1-го Конгр. Ассоциации «Национальная ассоциация фтизиатров», СПб. 2012. 281 с. Panteleev A.M. Tuberculosis drug resistance in patients with the HIV. In Proc. Actual problems and prospects of development of TB services in the Russian Federation: Mater. 1st Congreve. Association "National Association of TB specialists", St. Petersburg. 2012. 281 p. [in Russian].
 9. Правила лабораторной практики в Российской Федерации. Приказ МЗ РФ от 19.06.2003г., № 267. Terms of laboratory practices in the Russian Federation. Russian Ministry of Health Order from 19.06.2003, № 267 [in Russian].
 10. 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. Radtsig M.A. Interaction of bacterial cells with silver compounds and gold: the impact on growth, biofilm formation, mechanisms of action, biogenesis nanoparticles. Author. Dis. ... Cand. honey. Sciences. M., 2013. 24 p. [in Russian].
 11. Рахманин Ю.А., Хрипач Л.В., Михайлова Р.И. и др. Сравнительный анализ влияния нано- и ионной форм серебра на биохимические показатели лабораторных животных. Гигиена и санитария. 2014; 1: 45-50. Rahmanin Y.A., Khripatch L.V., Mikhailova R., I. et al. Comparative analysis of the effect of nano silver and ionic forms of biochemical indicators of laboratory animals. *Health and Sanitation*. 2014; 1: 45-50 [in Russian].
 12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ — 2-е изд., перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005: 41-53, 571-581. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances "- 2 nd ed., Revised. and ext. M.: JSC «Publishing house» Medicine, 2005: 41-53, 571-581 [in Russian].
 13. Савин Е.И., Субботина Т.И., Хадарцев А.А. и др. Экспериментальное исследование антибактериальной активности наночастиц серебра на модели перитонита и менингоэнцефалита in vivo // Вестник новых медицинских технологий (Электронный журнал). 2014; 1: 1-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4793.pdf>
 - Savin E.I., Subbotina T.I., Khadartsev A.A. et al. Experimental study of the antibacterial activity of silver nanoparticles on the model of peritonitis and meningoencephalitis in vivo. *Herald of new medical technologies (electronic magazine)*. 2014; 1: 1-6. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/4793.pdf> [in Russian].
 14. Сердюк А.М., Михиенкова А.И. Наночастицы серебра: характеристика и стабильность антимикробного действия композиции на основе высокодисперсного кремнезема. *Environment&Health*. 2011; 3: 8-11. Serdyuk A.M., Mihienkova A.I. Silver Nanoparticles: characterization and stability of the antimicrobial action of a composition based on highly dispersed silica. *Environment & Health*. 2011; 3: 8-11 [in Russian].
 15. Хохлов А.Л., Крейцберг Г.Н., Завойстый И.В. и др. Исследование антибактериальной эффективности коллоидных растворов наночастиц серебра. *Новости здравоохранения*. 2007; 2: 55-59. Khokhlov A.L., Kreuzberg G.N., Zavoysty I.V. et al. The study of antibacterial efficiency of silver nanoparticles colloidal solutions. *Health News*. 2007; 2: 55-59 [in Russian].
 16. Шульгина Т.А., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Изучение антибактериальной активности водных дисперсий наночастиц серебра и меди. *Вест. новых мед. технологий*. 2012; XIX(4): 131-132. Shulgina T.A., Norkin I.A., Puchinyan D.M. Study of aqueous dispersions of antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Fed. new medical. Technologies*. 2012; XIX(4): 131-132 [in Russian].
 17. Яминский И.В. Взгляд в микромир: от атомов и молекул — до живых клеток. М., Наука, 2006. 106 с. Yaminsky I.V. Look into microworld: from atoms and molecules — to living cells. *Nauka*, 2006. 106 p. [in Russian].
 18. Amin M. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and In vivo and In vitro therapeutic effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2014; 2014: 1-11.
 19. Bahador A., Esmaeili D., Khaledi A. et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties of nanosilver Iranian MTA against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2013; 10(5): 65-71.
 20. Niakan S., Niakan M., Hesaraki S. et al. Comparison of the Antibacterial Effects of Nanosilver With 18 Antibiotics on Multidrug Resistance Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013; 6(5): 1-5.
 21. Radzig M.A., Nadochenko V.A., Koksharova O.A. et al. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacterial: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013; 102: 300-306.
 22. Radzig M.A., Khmel I.A. Effect of silver nanoparticles on growth and biofilm formation of Gram-negative bacterial, mechanisms of action. III International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2012). Lisbon, Portugal, 21-23 november 2012.
 23. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva, 2015. // WHO/HTM/TB/2015.22.
 24. Zhao J., Castranova V. Toxicology of nanomaterials used in nanomedicine. *J. Toxicol. Environ Health B. Grit. Rev.*, 2011; 14: 593-632.

A

Статья получена/Article received 06.12.2016 г.
Принята к публикации/ Adopted for publication
13.03.2017 г.