ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА НАНОКОМПОЗИТОМ ИЗОНИАЗИДА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Б. С. Кибрик[1], А. В. Павлов[1], А. В. Захаров[2], Г. Н. Крейцберг[3]

На модели резистентного туберкулёза у белых мышей изучена противотуберкулёзная активность нанокомпозита на основе наночастиц серебра и изониазида. На основании индекса выживаемости, биометрических данных, бактериологических и патоморфологических показателей показана возможность преодоления резистентности возбудителя туберкулёза нанокомпозитом изониазида и наночастиц серебра. Установлены дозозависимые параметры присутствия наночастиц в составе композита. Проведённое исследование обосновывает перспективу использования наночастиц серебра в лечении лекарственно-устойчивого туберкулёза.

Ключевые слова: лекарственно-устойчивый туберкулёз, лечение, наночастицы серебра, нанокомпозит

ВВЕДЕНИЕ

Нарастание лекарственной устойчивости возбудителя определяет тенденцию снижения эффективности лечения туберкулёза лёгких. У впервые выявленных по обращаемости больных по критериям абациллирования и заживления полостей деструкции она не превышает 35 – 40 % [4]. Наряду с созданием новых туберкулостатиков перспективным является поиск фармакологических агентов ингибирующего действия, способных восстановить потенциал известных противотуберкулёзных химиопрепаратов. В качестве такого агента обсуждаются наночастицы серебра.

Доказано бактериостатическое и бактерицидное действие ионов серебра на лекарственно-устойчивые штаммы золотистого стафилококка, вульгарного протея, синегнойной и кишечной палочек [11, 13, 14]. Изучена способность ионов серебра инактивировать вирусы осповакцины, гриппа штаммов А-1, В, энтеро-, аденовирусов и ряд других возбудителей [8]. Биоцидный эффект серебра, как показали исследования, обусловлен его связыванием с мембран-ассоциированными белками и липидной стромой мембран, вследствие чего происходит изменение трансмембранного потенциала и гибель клетки [1, 2, 6].

Современные технологии получения серебра в наноразмерном диапазоне открывают новую перспективу его применения с антибактериальной целью [5, 7, 9]. Результаты ряда исследований свидетельствуют о возможности наночастиц серебра преодолевать лекарственную устойчивость ряда возбудителей [10, 12]. В литературе отсутствуют исследования по применению наносеребра в лечении лекарственно-устойчивого туберкулёза.

[1] ГОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, 150000, Ярославль, ул. Революционная, 5
[2] ГУЗ ЯО “Областная клиническая туберкулёзная больница”, Ярославль.
[3] НПО “Ликом”, Ярославль.

Проведённые нами исследования *in vitro* (2008) на изолятах лекарственно-устойчивых штаммов микобактерии туберкулёза показали возможность потенцирующего действия наночастиц серебра на химиопрепараты по преодолению резистентности возбудителя [3].

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в изолированном варианте и в составе нанокомпозита с изониазидом в исследованиях *in vivo* при лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза у животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 65 линейных и нелинейных белых мышах-самцах в соответствии с нормами и документами, регламентирующими проведение научных исследований с использованием экспериментальных животных, а также в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных (1996) с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001). Животные поступали из питомника-вивария ГУ ЦНИИТ РАМН и питомника Ярославля. Возраст мышей 2 – 2,5 мес, масса — 18 – 20 г. Рацион животных включал фирменные комбикорма (ПК 120; ГОСТ Р 50258–92) для разведения мышей и крыс с добавлением сырых овощей, творога, хлеба, витаминных добавок и дрожжей. Животных содержали в специальных клетках при естественном освещении в условиях автоматического кондиционирования воздуха с поддержанием температуры в пределах 22 – 23 °С и относительной влажности 50 – 70 %.

Заражение животных проводили двухнедельной вирулентной культурой *M. tuberculosis* лекарственно-устойчивого клинического штамма, выделенного от больного туберкулёзом. Инфицирующая доза $5 \cdot 10^6$ микробных тел в объёме 0,5 мл вводилась в область ретроорбитального

© 2011 Коллектив авторов

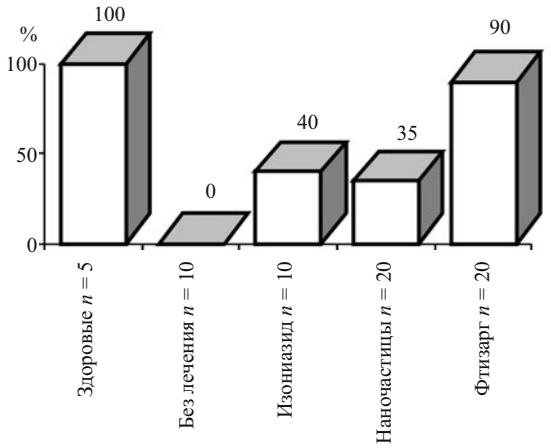

Рис. 1. Выживаемость животных в разных группах к 45-му дню эксперимента.

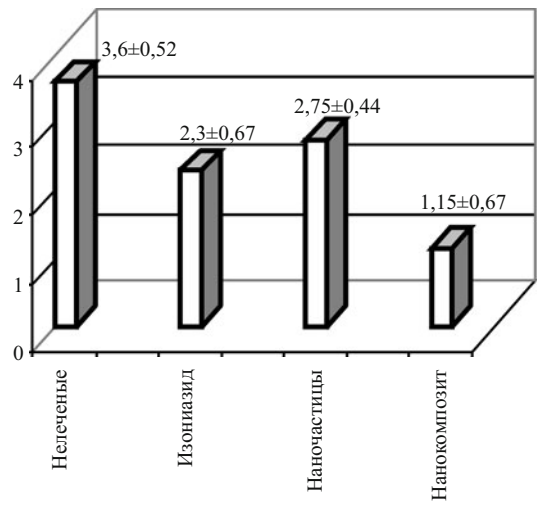

Рис. 2. Индексы высеваемости микобактерии туберкулёза из лёгочной ткани белых мышей при разных режимах лечения.

синуса. Развитие устойчиво воспроизводимой модели генерализованного туберкулёза у белых мышей верифицировали бактериологическими и патоморфологическими методами. Выведение животных из эксперимента проводили дислокацией шейных позвонков. Протокол эксперимента предусматривал разделение животных на контрольную и две опытные группы. В контроле выделяли следующие подгруппы: незаражённые (5), заражённые нелеченые (10), заражённые, леченые изониазидом в дозе 50 мг/кг (10). В первой опытной группе (20 особей) животные получали наночастицы серебра в монорежиме в следующих дозах — 12,5; 25; 50 и 125 мкг/кг по 5 мышей в каждой подгруппе. Во всех подгруппах второй опытной группы (20 особей) наночастицы серебра в указанных выше дозах сочетали с изониазидом в дозе 50 мкг/кг для всех животных. Нанокомпозит, содержащий изониазид и наночастицы серебра, получил условное название “Фтизарг”.

Лечение было начато через 4 дня после заражения и проводилось в течение 45 дней. Изониазид, наночастицы и нанокомпозит вводили животным внутримышечно ежедневно. Эффективность лечения определяли по следующим показателям: индексу выживаемости, динамике массы тела и паренхиматозных органов, индексу поражения внутренних органов, бактериоскопическому показателю и индексу высеваемости из поражённых органов.

Исследование наночастиц серебра, полученных электрохимическим методом в присутствии стабилизатора с цитратом аммония (Роспатент, регистрационный № 2008142461 от 28.10.2008 г., решение о выдаче патента на изобретение от 22.04.2010 г., № 151410), проведено в Центральной лаборатории электронной микроскопии Приволжского Федерального округа (Ярославль, протокол № 26 от 21.06.2010 г.). Основные параметры наночастиц серебра: размер — от 5 до 50 нм; количество в 1 мкм^2 – 120 – 270; размер оболочки, сформированной из стабилизатора — 2 – 5 нм.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении выживаемости животных установлено, что на момент гибели 100 % мышей контрольной группы, не получавших лечения, выживаемость особей, в лечении которых использовались наночастицы в сочетании с изониазидом (“Фтизарг”), составила 90 %. Индекс выживаемости мышей, получавших в изолированном режиме изониазид и наночастицы серебра составил соответственно 40 и 35 % (рис. 1).

Изучение динамики массы тела животных позволяет косвенно оценивать интенсивность катаболических процессов на фоне прогрессирования генерализованного туберкулёза. Как показали исследования, положительную динамику массы тела к окончанию эксперимента имели животные в трёх группах — незаражённые (+ 7,4 %) и леченные “Фтизаргом” с дозой по наночастицам 12,5 мкг/кг (+ 1,9 %) и 25 мкг/кг (+ 5,6 %). В группе нелеченых животных дефицит массы составил 23 %, при монотерапии изониазидом и наночастицами 6,1 и 7,8 % соответственно.

Эксудативно-альтеративные изменения во внутренних органах при генерализованном туберкулёзе сопровождаются увеличением их массы. При этом отношение массы органа к массе тела, т. н. коэффициент массы органа, на фоне снижения массы тела при прогрессировании заболевания тела закономерно увеличивается. Проведённые биометрические исследования констатировали наиболее приоритетные показатели коэффициента массы лёгких при использовании нанокомпозита — 2,7 ± 0,24 усл. ед. При монотерапии изониазидом и наночастицами коэффициент массы лёгочной ткани составил соответственно — 4,36 ± 0,45 усл. ед. и — 5,0 ± 0,79 усл. ед. ($p < 0,05$).

Индекс поражения, отражающий распространённость специфических изменений, имел максимальное значение в группе нелеченых животных — 2,7 ± 0,67 усл. ед. Использование в лечении экспериментальных животных нанокомпозита позволило снизить индекс поражения до

0,6 ± 0,68 усл. ед., при этом монотерапия изониазидом, к которому у возбудителя имелась устойчивость, обеспечила показатель 2,0 ± 0,82 усл. ед. ($p < 0,05$).

Показатели высеваемости культуры *M. tuberculosis* из лёгочной ткани при разных режимах лечения представлены на рис. 2. Наименьшая высеваемость наблюдалась в группе мышей, получавших лечение наночастицами в сочетании с изониазидом. Индекс высеваемости в этой группе составил 1,15 ± 0,67 усл. ед. против 3,6 ± 0,52 у нелеченых животных ($p < 0,001$), 2,3 ± 0,67 — получавших изониазид ($p < 0,05$) и 2,75 ± 0,44 — при лечении наночастицами серебра в изолированном режиме ($p < 0,05$). В ходе исследования установлено, что наименьшее значение индекса высеваемости (0,6 ± 0,55 усл. ед.) отмечалось при содержании наночастиц серебра в композите в дозе 25 мкг/кг массы животного.

Таким образом, изониазид в присутствии наночастиц серебра обладает способностью подавлять штаммы МБТ, имеющих изначальную устойчивость к химиопрепарату. При этом отмечается отчетливый дозозависимый эффект содержания наночастиц в составе композита. Наиболее выраженное туберкулостатическое действие отмечается при содержании наночастиц в композите в дозе 25 мкг/кг массы животного. В соответствии с коэффициентами пересчёта лечебная доза для человека составит 2 мкг/кг. Механизмы потенцирующего действия наночастиц на химиопрепараты по преодолению разистентности возбудителя туберкулеза требуют дальнейшего изучения. Не исключается ингибирующее влияние наносеребра на микобактериальную клетку с последующим “химиотерапевтическим уколом”.

ВЫВОДЫ

1. Использование в лечении экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулёза нанокомпозита изониазида и наночастиц серебра обеспечивает выживаемость 90 % животных против 40 % при монотерапии изониазидом ($p < 0,05$).

2. Наиболее благоприятные биометрические параметры, отражающие регрессию туберкулёзных изменений в органах экспериментальных животных, наблюдаются при лечении нанокомпозитом.

3. Использование нанокомпозита в лечении генерализованного резистентного туберкулёза у мышей снижает индекс поражения по сравнению с изолированным применением изониазида с 2 ± 0,82 усл. ед. до 0,6 ± 0,68 усл. ед. ($p < 0,05$).

4. Применение в лечении экспериментального туберкулёза у мышей нанокомпозита обеспечило снижение индекса высеваемости по сравнению с монотерапией изониазидом с 2,3 ± 0,67 усл. ед. до 1,15 ± 0,67 усл. ед.

5. Экспериментально установленная эффективная терапевтическая доза для белой мыши — 25 мкг/кг, что в перерасчёте на человека составляет 2 мкг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. К. Баранова, А. А. Ревина, Л. И. Войно, В. И. Горбатюк, *Наночастицы в природе*, Москва (2003), сс. 53 – 60.
2. Е. М. Благитко, В. А. Бурмистров, А. П. Колесников и др., *Серебро в медицине*, Наука-Центр, Новосибирск (2004).
3. Б. С. Кибрик, А. В. Захаров, О. Ю. Соснина, Г. Н. Крейцберг, *XIX Национальный конгресс по болезням органов дыхания*, Дизайн Пресс, Москва (2009), сс. 285 – 286.
4. В. Ю. Мишин, *Туберкулёз легких с лекарственной устойчивостью возбудителя*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2009).
5. Н. А. Пархоменко, И. Н. Юркова, В. И. Рябушко, *Труды Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия биология и химия*, **21**(60), 2, 106 – 112 (2008).
6. *Применение препаратов серебра в медицине*, Е. М. Благитко (ред.), Новосибирск (2004).
7. М. В. Самсонова, *Пульмонология*, № 5, 5 – 13 (2008).
8. A. Gupta, K. Matsui, J. F. Lo, S. Silver, *Nat. Med.*, **5**, 183 – 188 (1999).
9. A. Panaček, L. Kvitek, R. Prucek, et al., *J. Phys. Chem.*, **110**, 16248 – 16253 (2006).
10. S. K. Sahoo, S. Parveen, J. J. Panda, *Biology and Medicine*, **3**, 20 – 31 (2007).
11. A. R. Shahverdy, A. Fakhimi, S. Minaian, *Biology and Medicine*, **3**(2), 168 – 171 (2007).
12. S. Silver, *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 341 – 353 (2003).
13. I. Sondi, B. Salopek-Sondi, *J. Coll. Interface Sci.*, **275**, 177 – 182 (2004).
14. M. Raffi, F. Hussain, T. M. Bhatti, et al., *J. Mater. Sci. Technol.*, **24**, 192 – 196 (2008).

Поступила 08.10.10

OVERCOMING RESISTANCE OF TUBERCULOSIS INFECTIOUS AGENT BY ISONIAZID – SILVER NANOCOMPOSITE

B. S. Kibrik[1], A. V. Pavlov[1], A. V. Zakharov[2], and G. N. Kreitsberg[3]

[1] Yaroslavl State Medical University, ul. Revolyutsionnaya 5, Yaroslavl, Russia;
[2] Yaroslavl Regional Tuberculous Hospital, ul. Sobinova 43, Yaroslavl, Russia;
[3] LIKOM Company, Yaroslavl, Russia

The antituberculous activity of a nanocomposite based on nanoparticulate silver and isoniazid has been studied on the model of drug-resistant tuberculosis in a group of 65 white mice. The possibility of overcoming the resistance of the tuberculosis activator by the proposed nanocomposite of isoniazid and nanoparticulate silver is demonstrated in terms of the survival index, biometric data, bacteriological and pathomorphological parameters. Dose-dependent parameters of the presence of nanoparticulate silver in the composite structure are established. The results of preclinical research scientifically prove good prospects for using nanoparticulate silver in the treatment of drug-resistant tuberculosis.

Key words: Drug-resistant tuberculosis treatment, silver nanoparticles, isoniazide, nanocomposite