

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАНИЯ ИЗОНИАЗИДА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

А. В. ЗАХАРОВ<sup>1</sup>, А. Э. ЭРГЕШОВ<sup>2</sup>, А. Л. ХОХЛОВ<sup>3</sup>, Б. С. КИБРИК<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ТБУЗ ЯО «Областная клиническая туберкулезная больница», г. Ярославль, Россия

<sup>2</sup>ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Ярославль, Россия

**Цель исследования:** изучить влияние изониазида в сочетании с наночастицами серебра на устойчивые к изониазиду штаммы микобактерий туберкулеза (МБТ) и течение экспериментального туберкулеза, вызванного этими штаммами.

**Материалы и методы.** Наночастицы серебра получали методом электрохимического растворения металла, средний размер наночастиц 3-60 нм. Изучаемые концентрации наночастиц серебра составили 5; 25; 50 мкг/мл. Изониазид использовали только в концентрации 1 мг/мл. Всего было проведено 651 исследование *in vitro*.

Экспериментальную модель туберкулеза создавали путем заражения мышей (всего 68 мышей) двухнедельной вирулентной культурой *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

**Результаты.** Как показали исследования *in vitro*, сочетание изониазида с наночастицами серебра обеспечило полное и значительное подавление роста штамма МЛУ МБТ в 49,2% наблюдений. Минимальная подавляющая концентрация наночастиц в составе наноконструкта с изониазидом составила 2,5 мкг/мл, минимальная бактерицидная – 5 мкг/мл. Атомно-силовая микроскопия выявила изменения морфометрических параметров МЛУ МБТ после воздействия наночастиц серебра в сочетании с изониазидом в отличие от изолированного использования изониазида или наночастиц серебра. При лечении экспериментального туберкулеза по выживаемости и гистологической оценке легочной ткани было подтверждено преимущество сочетания изониазида с наночастицами серебра перед отдельным использованием компонентов.

**Ключевые слова:** множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза, экспериментальный туберкулез, наночастицы серебра, изониазид

**Для цитирования:** 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 лёгких. – 2017. – Т. 95, № 6. – С. 51-58. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-51-58

## EFFECTIVENESS OF COMBINATION OF ISONIAZID AND SILVER NANOPARTICLES IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

A. V. ZAKHAROV<sup>1</sup>, A. E. ERGESHOV<sup>2</sup>, A. L. KHOKHLOV<sup>3</sup>, B. S. KIBRIK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Regional Clinical Tuberculosis Hospital, Yaroslavl, Russia

<sup>2</sup>Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

**Goal of the study:** to investigate the impact of isoniazid combined with silver nanoparticles on the isoniazid resistant strains of tuberculous mycobacteria and the course of experimental of tuberculosis caused by the above strains.

**Materials and methods.** The electrochemical metal resolution was used to obtain silver nanoparticles, the average size of nanoparticles made 3-60 nm. The investigated concentrations of silver nanoparticles made 5; 25; 50 µg/ml. The isoniazid was used only in one concentration of 1 mg/ml. Totally there were 651 *in vitro* tests.

The experimental tuberculosis model included infecting mice (totally 68) with two-week virulent multiple drug resistant culture of *M. tuberculosis*.

**Results.** *In vitro* tests proved that isoniazid combined with silver nanoparticles fully or significantly suppressed the growth of MDR TB strain in 49.2% of cases. The minimal inhibitory concentration of nanoparticles in the combination with isoniazid made 2.5 µg/ml and minimal bactericidal concentration made 5 µg/ml. Atomic force microscopy detected the changes in morphometric parameters of MDR tuberculous mycobacteria after exposure to silver nanoparticles combined with isoniazid unlike the use of isoniazid only or silver nanoparticles. When treating experimental tuberculosis, survival rates and histological tests of the lung tissue confirmed that the combination of isoniazid and silver nanoparticles was preferable compared to the single use of the above components.

**Key words:** multiple drug resistance of tuberculosis mycobacteria, experimental tuberculosis, silver nanoparticles, isoniazid

**For citations:** Zakharov A.V., Ergeshov A.E., Khokhlov A.L., Kibrik B.S. Effectiveness of combination of isoniazid and silver nanoparticles in the treatment of experimental tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, Vol. 95, no. 6, P. 51-58. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-6-51-58

Наряду с разработкой и апробацией новых противотуберкулезных препаратов, актуальным является поиск средств, потенцирующих действие известных химиопрепаратов, так называемых адьювантов химиотерапии [8].

В качестве такого адьюванта предлагается использование наночастиц серебра [2-4]. В литературе имеются результаты исследований, посвященных антибактериальным свойствам наночастиц серебра, а также их способности потенцировать противо-

микробное действие препаратов [1, 5-7, 10]. Эти исследования показали, что применение серебра в наноразмерном диапазоне позволяет снизить его концентрацию с кратным увеличением биоцидных свойств, что явилось предпосылкой для изучения потенцирующего влияния наночастиц серебра на противотуберкулезный препарат изониазид при его взаимодействии со штаммами микобактерий туберкулеза (МБТ), характеризующихся устойчивостью к нему.

Цель исследования: изучить влияние изониазида в сочетании с наночастицами серебра на устойчивые к изониазиду штаммы МБТ и течение экспериментального туберкулеза, вызванного этими штаммами.

### Материалы и методы

В исследовании использовали водный раствор наночастиц серебра. Наночастицы получали методом электрохимического растворения металла, при этом средний размер наночастиц составлял 3-60 нм. Исследовали *in vitro* подавляющую активность изониазида в сочетании с наночастицами серебра на устойчивые к изониазиду штаммы МБТ. Изучаемые концентрации наночастиц серебра составили 5; 25; 50 мкг/мл. Изониазид использовали только в концентрации 1 мг/мл. Всего было проведено 651 исследование. Лекарственную устойчивость МБТ определяли с помощью метода абсолютных концентраций. Рост микобактерии оценивали 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 рассчитывали по соотношению количества КОЕ в контрольных и опытных образцах (контроль/опыт) и оценивали как:

- «+++»/«000»; «++»/«00»; «+»/«0» – полное подавление роста,
- «+++»/«+» – значительное подавление,
- «+++»/«++»; «++»/«+» – умеренное подавление,
- «+++»/«+++»; «++»/«++»; «+»/«+» – отсутствие подавления.

Определяли минимальную подавляющую и минимальную бактерицидную концентрации композита наночастиц серебра с изониазидом (далее нанокompозит). МБТ, подвергнутые действию нанокompозита, исследовали в атомно-силовом микроскопе Femto-Скан производства НПП «Центр перспективных технологий» (Москва). Изображение обрабатывали с использованием программы FemtoScan [9].

Изучение химиотерапевтической активности нанокompозита проводили на 68 белых мышах-самцах имбредной линии BALB/c, полученных из питом-

ника вивария Центрального научно-исследовательского института туберкулеза РАМН. Возраст мышей 2,0-2,5 месяца, масса 18-20 г. Экспериментальную модель туберкулеза создавали путем заражения мышей двухнедельными вирулентными культурами *M. tuberculosis*, которые в препаративных количествах были получены и аликвотированы в бактериологической лаборатории ГБУЗ ЯО «Областная клиническая туберкулезная больница». Инфицирующая доза для одной мыши составляла  $5 \times 10^6$  КОЕ. Заражение проводили внутривенно в область ретроорбитального синуса. Основными критериями в комплексе оценки эффективности лечения модельного туберкулеза у животных считали индекс выживаемости и результаты гистологического исследования легочной ткани.

При статистической обработке материала рассчитывали среднее значение показателя и величину средней ошибки. Статистическую достоверность показателей оценивали с помощью коэффициента достоверности Стьюдента, считая разницу достоверной при вероятности 95% и более ( $p < 0,05$ ). Статистическую обработку проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 и статистической компьютерной программы «Биостатика».

### Результаты исследования

Результаты подавляющей активности нанокompозита с различной концентрацией серебра на штаммы МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ МБТ) представлены в табл. 1. Полное и значительное подавление роста МЛУ МБТ отмечалось соответственно в 145 ( $22,3 \pm 3,4\%$ ) и 175 ( $26,9 \pm 3,3\%$ ) наблюдениях из 651. Максимальная подавляющая активность нанокompозита наблюдалась при концентрации наночастиц серебра 5 мкг/мл. Полное и значительное подавление роста штаммов МЛУ МБТ наблюдалось при данной концентрации в 91,3% случаев.

При концентрациях серебра 50 мкг/мл подавляющий эффект нанокompозита был менее выражен. Проведенные исследования позволили установить, что минимальная подавляющая концентрация нанокompозита проявляется при концентрации серебра 2,5 мкг/мл, минимальная бактерицидная концентрация – при 5 мкг/мл.

Для визуальной оценки происходящих с МБТ изменений под влиянием нанокompозита использован атомно-силовой микроскоп. Исследовали 25 образцов МЛУ МБТ, обработанных реагентами: 5 образцов – изониазидом в концентрации 1 мкг/мл, 10 образцов – изолированными наночастицами серебра в концентрации 10 мкг/мл и 10 образцов – нанокompозитом (изониазид – 1 мкг/мл, наночастицы серебра – 5 мкг/мл).

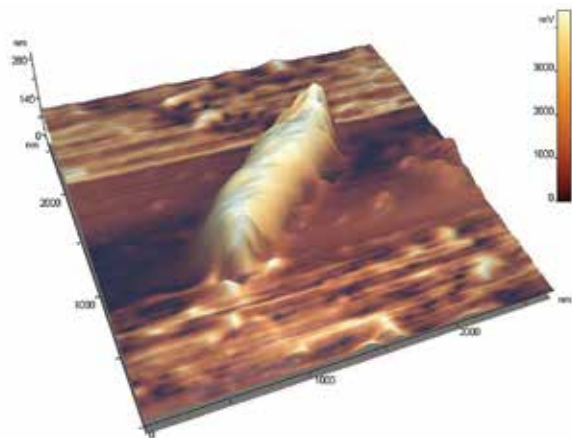
Экспозиция МБТ отдельно только изониазидом или наночастицами серебра не приводила к изменениям морфологии возбудителя. На рис. 1 пред-

**Таблица 1. Частота подавления роста МЛУ МБТ при разных концентрациях серебра в нанокompозите**

**Table 1. Frequency of inhibition of MDR tuberculosis mycobacteria growth under various concentrations of silver in the nanocomposite material**

Подавление роста контроль/опыт	Концентрация серебра в нанокompозите (мкг/мл)			
	5	25	50	Всего
Полное «+++»/«000»	108	33	4	145
%	49,8 ± 4,8	15,2 ± 6,2	1,8 ± 6,7	22,3 ± 3,4
Значительное «+++»/«+»	90	56	29	175
%	41,5 ± 5,1	25,8 ± 5,8	13,4 ± 6,4	26,9 ± 3,3
Умеренное «+++»/«++»	6	89	75	170
%	2,8 ± 7,3	41,0 ± 5,2	34,6 ± 5,4	26,1 ± 3,3
Отсутствует «+++»/«+++»	13	39	109	161
%	6,0 ± 6,8	18,0 ± 6,1	50,2 ± 4,7	24,7 ± 3,4
<b>Всего</b>	<b>217</b>	<b>217</b>	<b>217</b>	<b>651</b>
%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

ставлена МБТ после 24-часовой экспозиции с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл. Микобактерия имеет вытянутую форму в виде палочки с размерами: длина – 2,5 мкм; ширина – 0,5 мкм. Видимых морфологических изменений не отмечается.

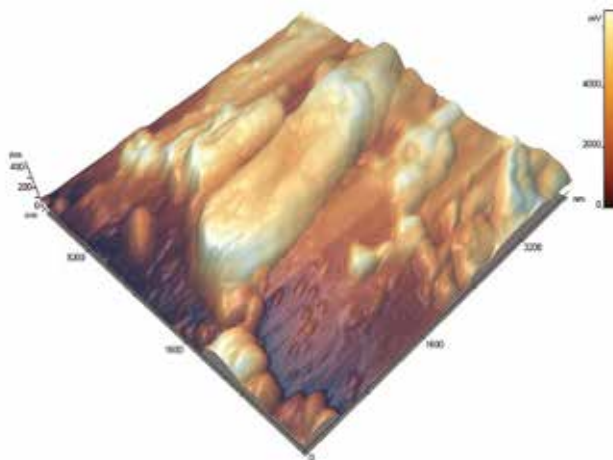


**Рис. 1. МЛУ МБТ после 24-часовой экспозиции с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл (атомно-силовая микроскопия)**

**Fig. 1. MDR tuberculosis mycobacteria after 24-hour exposure to isoniazid in the concentration of 1 µg/ml (atomic force microscopy)**

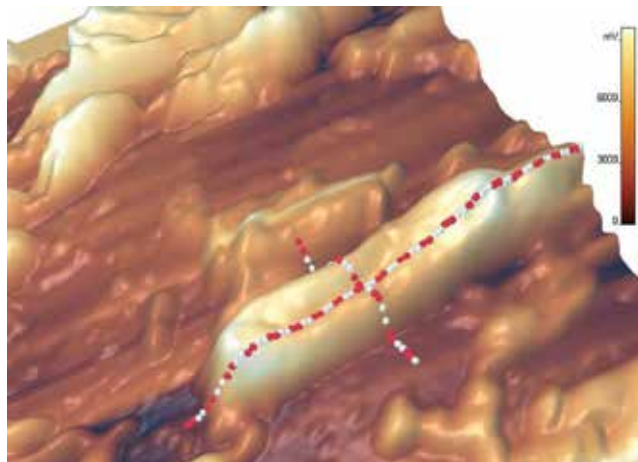
На рис. 2 и 3 представлена МЛУ МБТ после 24-часовой экспозиции в растворе нанокompозита (изониазид 1 мкг/мл и наночастицы серебра 5 мкг/мл). Отчетливо видно появление продольного вдавления, связанного со снижением внутреннего упругого напряжения клетки и нарушением исходных параметров бактериальной стенки.

Химиотерапевтическую активность нанокompозита оценивали на модели экспериментального туберкулеза у имбредных мышей *in vivo*. Выделены следующие группы животных.



**Рис. 2. МЛУ МБТ после 24-часовой экспозиции в растворе изониазида (концентрация 1 мкг/мл) с наночастицами серебра (концентрация 5 мкг/мл)**

**Fig. 2. MDR tuberculosis mycobacteria after 24-hour exposure to the solution of isoniazid (concentration of 1 µg/ml) and silver nanoparticles (concentration of 5 µg/ml)**



**Рис. 3. Поперечный профиль поврежденного нанокompозитом МЛУ возбудителя туберкулеза**

**Fig. 3. Cross section of MDR tuberculosis mycobacteria affected by the nanocomposite material**

Контрольные группы (К):

- а) незараженные животные – 5 животных;
- б) зараженные, нелеченные – 10 животных;

в) зараженные, леченные изониазидом в дозе 50 мг/кг массы – 10 животных.

Опытные группы (О):

- 1-я группа – зараженные, леченные наночастицами серебра (20 животных), в том числе 5 животных – в дозе 12,5 мкг/кг, 5 животных – в дозе 25 мкг/кг, 5 животных – в дозе 50 мкг/кг, 5 животных – в дозе 125 мкг/кг;

- 2-я группа – зараженные, леченные нанокompозитом (20 животных): по изониазиду доза в композите была универсальной и составляла 50 мг/кг, по наночастицам серебра: доза 12,5 мкг/кг – 5 животных, доза 25 мкг/кг – 5 животных, доза 50 мкг/кг – 5 животных, доза 125 мкг/кг – 5 животных.

Дополнительно были инфицированы стандартной дозой культуры МБТ 3 мыши для верификации индуцирования у животных генерализованного туберкулезного процесса. Результаты макроскопических и микробиологических исследований убедительно свидетельствовали о создании у животных генерализованного туберкулеза, что позволяло проводить изучение противотуберкулезной активности нанокompозита. Лечение было начато через 14 дней после заражения и проводилось в течение 45 дней до момента гибели последнего животного из группы инфицированных, нелеченных (К «б»). Изониазид, наночастицы и нанокompозит вводили лабораторным животным внутримышечно ежедневно в виде растворов.

Данные по выживаемости мышей представлены в табл. 2.

Как следует из табл. 2, все незараженные животные (группа К «а») к окончанию опыта остались живы, их состояние в ходе эксперимента не менялось. В группе К «б» зараженные животные не подвергались лечению, все 10 мышей погибли от генерализованного туберкулезного процесса. Индекс выживаемости – 0%. В группе К «в» лечение зараженных животных проводилось изониазидом в дозе 50 мг/кг массы, несмотря на устойчивость МБТ к изониазиду, индекс выживаемости составил 40%. В первой опытной группе (О1) лечение зараженных мышей проводили наночастицами

серебра, индекс выживаемости составил 35%. При этом имелись отличия выживаемости животных, получавших разные дозы серебра. Так, в подгруппе с дозой серебра 125 мкг/кг погибли все мыши с пиком падежа в сроки от 30 до 35 дней. Индекс выживаемости в подгруппах животных, получавших наночастицы в дозах 12,5 и 50 мкг/кг, составил 40%. Максимальная выживаемость при использовании только наночастиц серебра наблюдалась при дозе 25 мкг/кг – 60%, причем гибель отмечалась в более поздние сроки – от 35 до 40 дней. Таким образом, отмечается более выраженное влияние дозы наночастиц серебра 25 мкг/кг на увеличение продолжительности жизни зараженных животных.

Наиболее высокая выживаемость экспериментальных животных наблюдалась в опытной группе 2 (О2), где применяли для лечения нанокompозит со стандартной дозой изониазида 50 мг/кг и разными дозами серебра. В целом по группе индекс выживаемости составил 90%. По одному животному пали в подгруппах, где в нанокompозите концентрация серебра была 50 и 125 мкг/кг, при этом сроки падежа – после 35-го дня опыта. При использовании нанокompозита с содержанием серебра 12,5 и 25 мкг/кг индекс выживаемости составил 100%. Разница показателей индекса выживаемости при использовании нанокompозита в сравнении с группами, где применяли изолированный изониазид (К «в») и только наночастицы серебра (О1), статистически достоверна ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, по данным индекса выживаемости наибольшей химиотерапевтической активностью в лечении экспериментального туберкулеза у животных, инфицированных лекарственно-устойчивым штаммом МБТ, обладал нанокompозит на основе изониазида с содержанием наночастиц в дозах 12,5 и 25 мкг/кг. Следовательно, полученные на модели экспериментального туберкулеза данные свидетельствуют о потенцирующем действии наночастиц серебра и изониазида при лечении экспериментального туберкулеза, вызванного МЛУ МБТ.

Объективным критерием эффективности лечения является патоморфологическая оценка тканей. У животных контрольной группы К «б» (зараженные, нелеченные) в легочной ткани определялось значительное количество инфильтративных изменений. Сливной характер инфильтрации наблюдался у 9 (90%) животных (табл. 3). У всех мышей отмечалось выраженное снижение воздушности легочной ткани. В альвеолах определялись явления серозной и фибринозной экссудации. В периваскулярной зоне фиксировались крупные лимфогистиоцитарные инфильтраты.

В то же 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

**Таблица 2. Выживаемость экспериментальных животных в наблюдаемых группах**

**Table 2. Survival of experimental animals in the investigated groups**

№ группы	Число мышей	Погибло животных в ходе эксперимента (абс.)							Всего погибли	Всего выжили	Индекс выживаемости
		Сроки после начала лечения (дни)									
		10	20	25	30	35	40	45			
Контрольные группы											
К «а»	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
К «б»	10	---	---	---	2	6	1	1	10	0	0%
К «в»	10	---	---	---	---	3	3	---	6	4 <sup>°</sup>	40%
Зараженные, леченные наночастицами серебра разной концентрации (опытная группа 1)											
О1-12,5	5	---	---	---	1	1	1	---	3	2	40%
О1-25	5	---	---	---	---	---	2	---	2	3	60%
О1-50	5	---	---	---	2	1	---	---	3	2	40%
О1-125	5	---	---	---	1	3	1	---	5	0	0%
Всего:	20	---	---	---	4	5	4	---	13	7 <sup>^</sup>	35%
Зараженные, леченные нанокompозитом с разной концентрацией серебра (опытная группа 2)											
О2-12,5	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
О2-25	5	---	---	---	---	---	---	---	0	5	100%
О2-50	5	---	---	---	---	---	---	1	1	4	80%
О2-125	5	---	---	---	---	---	1	---	1	4	80%
Всего:	20	---	---	---	---	---	1	1	2	18 <sup>*</sup>	90%

Примечание: между \* и ^; \* и ° ( $p < 0,05$ )



**Таблица 3.** Характер и распространенность специфического поражения легочной ткани**Table 3.** Type and extent of the tuberculous lesions in the lung tissue

Группа	Сливной характер инфильтрации	Очаговый характер инфильтрации	Выраженное снижение воздушности	Множественные гранулемы	Отдельные гранулемы
Контрольные группы					
К «а» n = 5	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
К «б» n = 10	9	1	10	–	–
К «в» n = 10	6	4	6	–	3
Опытные группы					
О1 n = 20	12	8	15	–	6
О2 n = 20	4	16	6	9	7

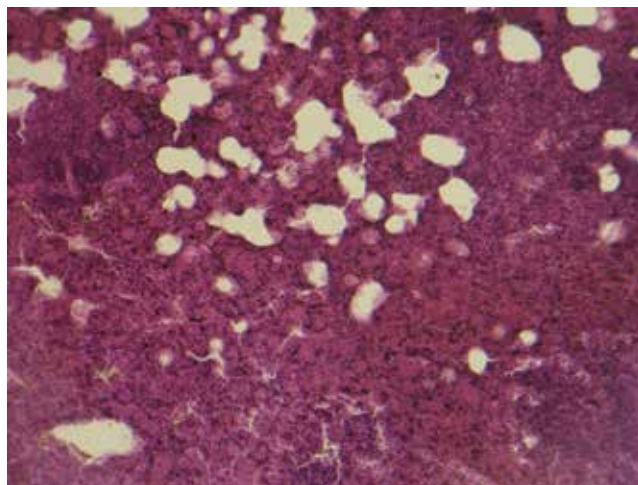
животных из 10) отмечались выраженные скопления нейтрофильных лейкоцитов с формированием дегрита и участков казеозного некроза (табл. 4).

**Таблица 4.** Клеточный состав инфильтратов и гранулем**Table 4.** Cell composition of infiltrates and granulomas

Группа	Единичные нейтрофилы	Скопления нейтрофилов	Скопления эпителиоидных клеток	Лимфоидные гранулемы	Эпителиоидные гранулемы
К «а» n = 5	Норма	Норма	Норма	Норма	Норма
К «б» n = 10	1	9	4	–	–
К «в» n = 10	6	4	6	2	1
О1 n = 20	14	6	8	4	2
О2 n = 20	2	–	2	5	11

Наличие нейтрофильных гранулоцитов свидетельствовало о превалировании альтеративных воспалительных изменений с прогрессированием специфического туберкулезного процесса. Патоморфологическая картина изменений в легких экспериментальных животных, не получавших лечения, представлена на рис. 4.

Использование в лечении изониазида (группа К «в») способствовало некоторому уменьшению распространенности специфического воспаления. Зоны инфильтративных изменений имели тенденцию к фрагментации и располагались отдельными очагами, чаще периваскулярно и перибронхиально. Сливные инфильтративные изменения наблюдались в этой группе у 6 (60%) мышей, у 4 животных инфильтрация имела очаговый характер с относительно четкими границами, при этом лимфоциты располагались вокруг единичных эпителиоидных клеток или их скоплений. Таким образом, наме-



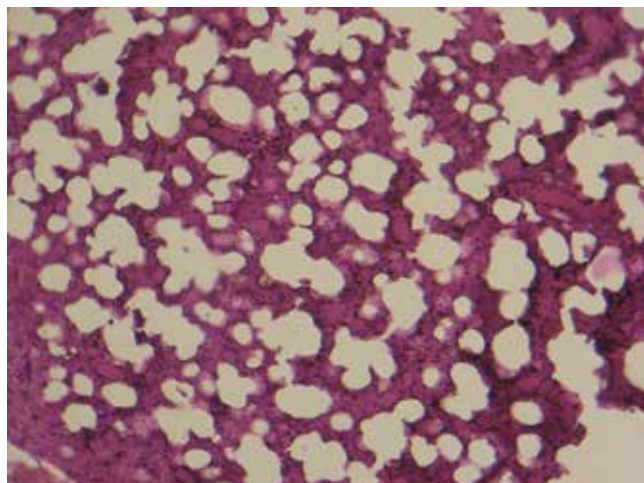
**Рис. 4.** Легочная ткань зараженной мыши, не получавшей лечения. Видны лимфогистиоцитарные инфильтраты, скопления макрофагов, полиморфно-ядерных лейкоцитов с формированием зон некроза. Резкое снижение воздушности легочной ткани. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 400$

**Fig. 4.** The lung tissue of the mouse receiving no treatment. One could see lymphohistiocytic infiltrates, clusters of macrophages and polymorphonuclear leukocytes with formation of necrotic parts. Abrupt reduction of the lung tissue airiness. Hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$

чалось формирование лимфоидно-клеточных и эпителиоидно-клеточных гранулем. Лимфоидные гранулемы отмечены у 2 (20%) животных, эпителиоидные – у 1 (10%). В зонах специфической инфильтрации альвеолы и межальвеолярные перегородки были инфильтрированы 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. Характер патоморфологических изменений в легких мышей при монотерапии изониазидом представлен на рис. 5.

В группе О1, где применяли изолированные наночастицы серебра, также отмечали некоторое уменьшение распространенности зон специфического воспаления. Сливные инфильтративные изменения зафиксированы у 12 (60%) животных, у 8 мышей инфильтрация имела очаговый характер. Экссудативные изменения с выраженным снижением воздушности легочной ткани имели место у 15 (75%) животных. В 6 препаратах этой группы наблюдалось формирование отдельных гранулем, в 4 случаях гранулемы имели макрофагально-лимфоцитарный состав, в 2 – наблюдались эпителиоидные гранулемы.

Как показали гистологические исследования, использование нанокompозита (группа О2) способствовало уменьшению распространенности специ-

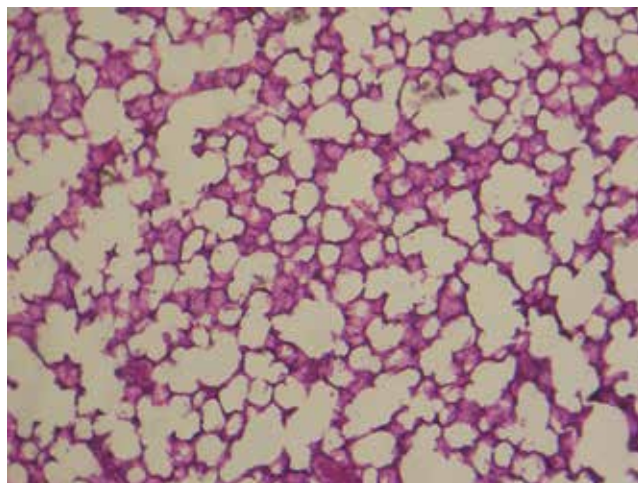


**Рис. 5.** Легочная ткань мыши, зараженной МЛУ МБТ и леченной изониазидом. Межальвеолярные перегородки резко утолщены за счет инфильтрации их клеточными элементами, сосуды полнокровны. Воздушность легочной ткани значительно снижена. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 400$

**Fig. 5.** The lung tissue of the mouse infected with MDR tuberculous mycobacteria and treated with isoniazid. Inter-alveolar septum is abruptly thickened due to infiltration by cellular elements; vessels are plethoric. The lung tissue airiness is significantly compromised. Hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$

фических воспалительных изменений в легочной ткани животных. Выраженное снижение воздушности легочной ткани отмечалось у 6 (30%) животных. Сливные инфильтративные изменения зафиксированы у 1 (5%) мыши, у 7 инфильтрация носила крупно- и среднеочаговый характер, у 12 – мелкоочаговый. В 9 случаях наблюдались множественные гранулемы, у 7 животных – отдельные гранулемы. Нейтрофильные гранулоциты не встречались. В гранулемах в значительном количестве обнаружены макрофагально-эпителиоидные элементы, клетки типа Пирогова – Лангханса. Эпителиоидные гранулемы наблюдались у 11 (55%) животных, лимфоидные – у 5 (25%). Преобладание эпителиоидных клеток, многоядерных гигантских клеток Пирогова – Лангханса отражает преимущественно продуктивный тип тканевой реакции и свидетельствует о положительной динамике течения воспалительного процесса. Патоморфологические изменения в легких экспериментальных животных, получавших лечение нанокompозитом, представлены на рис. 6.

Таким образом, наиболее выраженные положительные сдвиги в гистологической картине наблюдались у животных при использовании для лечения туберкулеза нанокompозита. Как показали исследо-



**Рис. 6.** Воздушная легочная ткань мыши, зараженной МЛУ МБТ и получавшей лечение нанокompозитом. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 400$  (описание в тексте)

**Fig. 6.** The lung tissue of the mouse infected with MDR tuberculous mycobacteria and treated with the nanocomposite material. Hematoxylin-eosin staining,  $\times 400$ . (described in the text)

вания, у них в легочной ткани отмечалось снижение распространенности специфического воспаления с уменьшением зон инфильтративных изменений, а характер специфического воспаления имел преимущественно продуктивный характер.

## Выводы

1. В эксперименте *in vitro* воздействие нанокompозита (изониазид и наночастицы серебра) обеспечило полное и значительное подавление роста МЛУ МБТ в 49,2% наблюдений.
2. Экспериментально установлено, что в сочетании с изониазидом в концентрации 1 мкг/мл минимальная подавляющая концентрация наночастиц серебра составляет 2,5 мкг/мл при воздействии на штаммы МЛУ МБТ. Минимальная бактерицидная концентрация наночастиц при тех же параметрах изониазида зафиксирована на уровне 5 мкг/мл.
3. При атомно-силовой микроскопии выявлено изменение морфометрических характеристик МЛУ МБТ при воздействии нанокompозита (изониазид в сочетании с наночастицами серебра) и не обнаружено таковых при раздельном воздействии его компонентов.
4. На модели экспериментального туберкулеза по данным патоморфологического исследования показано, что использование нанокompозита дает лучшие результаты лечения туберкулеза, чем раздельное применение его компонентов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

**Conflict of Interests.** The authors state that they have no conflict of interests.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова Е. М., Ревина А. А., Ростовщикова Т. Н., Киселева О. И. Бактерицидные и каталитические свойства стабильных металлических наночастиц в обратных мицеллах // Вестн. моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2001. – Т. 42, № 5. – С. 332-338.
2. Захаров А. В., Кибрик Б. С., Крейтсберг Г. Н. Оценка бактериостатических и бактерицидных параметров противотуберкулезных композитов на основе наночастиц серебра. // В кн. XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» по болезням органов дыхания: Сборник материалов конгресса. Тезисы докладов. – М., 2010. – С. 618.
3. Захаров А. В., Кибрик Б. С., Павлов А. В. Эффективность лечения экспериментального туберкулеза с использованием наночастиц серебра // Туб. и болезни легких. – 2011. – № 4. – С. 151-152.
4. Кибрик Б. С., Павлов А. В., Захаров А. В. и др. Экспериментальное обоснование преодоления резистентности возбудителя туберкулеза на нанокompозитом изониазида и наночастиц серебра // Экспер. и клинич. фармакология. – 2011. – Т. 74, № 4. – С. 24-26.
5. Крутяков Ю. А., Кудринский А. А., Оленин А. Ю., Лисичкин Г. В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы. // Успехи химии. – 2008. – № 3. – С. 242-269.
6. Радциг М. А. Взаимодействие клеток бактерий с соединениями серебра и золота: влияние на рост, образование биопленок, механизмы действия, биогенез наночастиц: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2013. – 24 с.
7. Радциг М. А., Хмель И. А. Особенности антибактериального действия наночастиц серебра // 3-й Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010». – М., 2010, 21-25 июня. – Т. 3. – Раздел: Нанотехнологии в медицине. – С. 324-326.
8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. Издание третье // Утверждены на X съезде «Российского общества фтизиатров» 28.05.2015 г. и Профильной комиссии по специальности «Фтизиатрия» Минздрава России 13.11.2015 г.
9. Яминский И. В. Взгляд в микромир: от атомов и молекул – до живых клеток. М., Наука, 2006. – 106 с.
10. Anh-Tuan Le, Huy P.T., Tran Quang Huy и др. Фотохимический синтез наночастиц серебра, обладающих высокой антибактериальной активностью // Рос. нанотехнологии. – 2010. – № 7-8. – С. 125-131.

## ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

**Захаров Андрей Владимирович**

ГБУЗ ЯО «Областная клиническая туберкулезная больница»,  
кандидат медицинских наук, заведующий отделением  
легочного туберкулеза.  
150000, г. Ярославль, ул. Собинова, д. 43.  
Тел./факс: 8 (4852) 43-97-25.  
E-mail: Yrzahan@mail.ru

**Эргешов Атаджан Эргешович**

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,  
доктор медицинских наук, профессор, директор.  
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2.  
Тел.: 8 (499) 785-90-19.  
E-mail: cnit@cetri.ru

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ,  
150000, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5.

## REFERENCES

1. Egorova E.M., Revina A.A., Rostovshikova T.N., Kiseleva O.I. Bactericidal and catalytic properties of stable metal nanoparticles in inverted micelles. *Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 2. Khimiya*, 2001, vol. 42, no. 5, pp. 332-338. (In Russ.)
2. Zakharov A.V., Kibrik B.S., Krejtsberg G.N. Evaluation of bacteriostatic and bactericidal parameters of anti-tuberculosis nanocomposite materials based on silver nanoparticles. *V kn. XVII Rossiyskiy natsionalny kongress «Chelovek i lekarstvo» po boleznyam organov dykhaniya: Sbornik materialov kongressa. Tezisy dokladov.* [Abst. book of the XVIIth Russian National Congress on Man and Drug. Respiratory Diseases]. Moscow, 2010, pp. 618. (In Russ.)
3. Zakharov A.V., Kibrik B.S., Pavlov A.V. Treatment efficiency of experimental tuberculosis with the use of silver nanoparticles. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2011, no. 4, pp. 151-152. (In Russ.)
4. Kibrik B.S., Pavlov A.V., Zakharov A.V. et al. Experimental justification of overcoming the resistance of tuberculous mycobacteria by the nanocomposite material consisting of isoniazid and silver nanoparticles. *Eksperimental. i Klinich. Farmakologiya*, 2011, vol. 74, no. 4, pp. 24-26. (In Russ.)
5. Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Olenin A.Yu., Lisichkin G.V. Synthesis and properties of silver nanoparticles: achievements and prospectives. *Uspekhi Khimii*, 2008, no. 3, pp. 242-269. (In Russ.)
6. Radtsig M.A. *Vzaimodeystvie kletok bakteriy s soedineniyami srebra i zolota: vliyaniye na rost, obrazovaniye bioplenok, mekhanizmy deystviya, biogenez nanochastits* Diss. kand. med. nauk. [Interaction of bacterial cells with silver and gold compounds: impact on their growth, formation of biofilms, action mechanisms, biogenesis of nanoparticles. Cand. Diss.]. Moscow, 2013, 24 p.
7. Radtsig M.A., Khmel I.A. The specific antibacterial action of silver nanoparticles. *3-y Evraziyskiy kongress po meditsinskoy fizike i inzhenerii «Meditsinskaya fizika – 2010».* [The 3rd Eurasian Congress on Medical Physics and Engineering - 2010]. Moscow, 2010, June 21-25, 2016 vol. 3, Part on Nanotechnologies in Medicine. pp. 324-326. (In Russ.)
8. *Federalnyye klinicheskiye rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu tuberkuleza organov dykhaniya s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivostyu vozбудitelya.* [Federal clinical recommendations for diagnosis and treatment of respiratory tuberculosis with multiple drug resistance]. 3rd Edition. Approved at the Xth Meeting of the Russian Society of Phthisiologists as of 28.05.2015 and Profile Commission in Phthisiology by the Russian Ministry of Health as of 13.11.2015.
9. Yaminskiy I.V. *Vzglyad v mikromir: ot atomov i molekul – do zhivykh kletok.* [Insight into microworld – from atoms and molecules to living cells]. Moscow, Nauka Publ., 2006, 106 p.
10. Anh-Tuan Le, Huy P.T., Tran Quang Huy et al. Photochemical synthesis of silver nanoparticles possessing high anti-bacterial action. *Ros. Nanotekhnologii*, 2010, no. 7-8, pp. 125-131. (In Russ.)

## FOR CORRESPONDENCE:

**Andrey V. Zakharov**

Regional Clinical Tuberculosis Hospital,  
Candidate of Medical Sciences,  
Head of Pulmonary Tuberculosis Department.  
43, Sobinova St.,  
Yaroslavl, 150000  
Phone/Fax: +7 (4852) 43-97-25.  
E-mail: Yrzahan@mail.ru

**Atadzhan E. Ergeshov**

Central Tuberculosis Research Institute,  
Doctor of Medical Sciences, Professor, Director.  
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564  
Phone: +7 (499) 785-90-19.  
E-mail: cnit@cetri.ru

Yaroslavl State Medical University,  
5, Revolyutsionnaya St.,  
Yaroslavl, 150000

**Хохлов Александр Леонидович**

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент  
РАМН, заведующий кафедрой клинической фармакологии  
с курсом института последипломного образования.

Тел.: 8 (4852) 45-84-61.

E-mail: al460935@yandex.ru.

**Кибрик Борис Семёнович**

доктор медицинских наук, профессор кафедры  
туберкулеза.

Тел.: 8 (4852) 48-41-38.

**Aleksandr L. Khokhlov**

Doctor of Medical Sciences, Professor, Correspondent Member  
of RAMS, Head of Clinical Pharmacology Department  
with Post-Graduate Training Course.

Phone: +7 (4852) 45-84-61.

E-mail: al460935@yandex.ru.

**Boris S. Kibrik**

Doctor of Medical Sciences,  
Professor of Tuberculosis Department.

Phone: +7 (4852) 48-41-38.

Поступила 25.11.2016

Submitted as of 25.11.2016