

Калмантаева Ольга Валериевна

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ
СЕРЕБРА, УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА МОДЕЛИ ЗДОРОВЫХ И ИНФИЦИРОВАННЫХ
Mycobacterium tuberculosis МЫШЕЙ**

03.02.03 – микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Оболенск-2016

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук **Фирстова Виктория Валерьевна**

Научный консультант:

Доктор биологических наук **Потапов Василий Дмитриевич**

Официальные оппоненты:

Афанасьев Станислав Степанович – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ, заместитель директора по биотехнологии

Черноусова Лариса Николаевна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное бюджетное государственное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Федерального агентства научных организаций, заведующая отделом микробиологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава РФ, г. Екатеринбург

Защита диссертации состоится «5» февраля 2016 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Туберкулез (ТБ) – является одной из социально значимых инфекций в мире. Несмотря на все проводимые мероприятия по борьбе с ТБ, уровень заболеваемости и смертности от данной инфекции остается высоким. По последним оценкам в 2013 году было установлено 9,0 миллионов новых случаев заболевания туберкулезом и 1,5 миллиона случаев смерти от ТБ в мире. Заболеваемость ТБ в России в 2013 году составляла 89 случаев на 100 тысяч человек, смертность - 12 случаев на 100 тысяч россиян (WHO, 2014). При этом стабильно высоким остается количество пациентов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя туберкулеза: 37,5% среди больных ТБ органов дыхания (ФЦГиЭ Роспотребнадзора, 2013). Для лечения туберкулеза применяют пять основных противотуберкулезных препаратов: изониазид, рифампицин, пипразинамид, этамбутол и стрептомицин. Основными недостатками данной терапии являются: резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к антибиотикам и побочные действия применяемых препаратов из-за длительности приема и отсутствия адресной доставки в пораженные органы. В случаях лекарственно устойчивого туберкулеза используют резервные противотуберкулезные препараты, комбинирование которых и длительность приема до сих пор носят в основном эмпирический характер. Поэтому в настоящее время актуальной проблемой является поиск альтернативных способов лечения ТБ.

Сегодня в этой области разрабатываются несколько направлений, включающих использование моноклональных антител, бактериофагов, бактериальных вакцин и иммуномодуляторов. Одним из современных направлений борьбы с ТБ является использование нанотехнологических подходов. Нанотехнологии позволяют преодолевать сложности в терапии туберкулеза: доставлять антимикробное вещество непосредственно внутрь пораженных клеток, используя в качестве носителей наночастицы, и применять бактерицидный потенциал некоторых металлов в наноформе, к которым нет резистентности у патогенов (Andrade, 2013). Перспективными с этой точки зрения являются наночастицы серебра (НЧС) и углеродные нанотрубки (УНТ). Наночастицы серебра характеризуются бактерицидностью против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (Sarsar, 2014; Wijnhoven, 2009), включая антибиотикорезистентные штаммы (Rai, 2012). Кроме того, наноча-

стицы серебра увеличивают антибактериальную активность различных антибиотиков (Shahverdi, 2007). Углеродные нанотрубки широко применяются для адресной доставки лекарств в пораженные органы (Madani, 2011). Имеются данные о бактерицидной активности углеродных нанотрубок (Dong, 2012; Tegos, 2012; Yang, 2010; Agias, 2009). Однако применение наночастиц в медицине подразумевает проведение предварительной тщательной оценки их безопасности и эффективности.

Степень разработанности темы исследования

В научной литературе существует большое количество работ, посвященных токсикологической оценке наночастиц серебра и углеродных нанотрубок и свидетельствующих о том, что токсичность данных наночастиц зависит от многих факторов, таких как размер, поверхностное покрытие, доза, способ и многократность введения (Maunard, 2011; Wijnhoven, 2009; Oberdorster, 2005). Однако на данный момент в литературе практически отсутствуют систематизированные данные о воздействии наночастиц на иммунную систему. Также редко проводятся комплексные исследования воздействия наночастиц на такие внутриклеточные бактерии как *M. tuberculosis*. Так, в научной литературе работы, посвященные изучению антимикобактериальной эффективности наночастиц серебра, немногочисленны и в основном показывают ингибирующую рост *M. tuberculosis* активность данных наночастиц в экспериментах *in vitro* (Praba, 2013; Seth, 2011; Song, 2006). Исследований антимикобактериального действия наночастиц на животных моделях хронического ТБ с одновременной оценкой изменения иммунных показателей в доступной научной литературе нами обнаружено не было. Известно, что развитие туберкулеза сопровождается возникновением иммунодефицитного состояния организма. В связи с вышесказанным, актуальным является комплексное изучение антимикобактериального действия наночастиц и иммунного статуса больных туберкулезом животных.

Цель исследования — оценить антибактериальные, иммунобиологические и токсикологические свойства наночастиц серебра, углеродных нанотрубок и выявить особенности их действия на иммунную систему здоровых и инфицированных *M. tuberculosis* экспериментальных мышей, в зависимости от пути проникновения этих частиц в макроорганизм.

Задачи исследования

1. Оценить физические параметры углеродных нанотрубок и наночастиц серебра.
2. Изучить бактерицидные свойства углеродных нанотрубок и наночастиц серебра по отношению к возбудителям различных бактериальных инфекций в системе *in vitro*, в том числе к возбудителю туберкулеза.
3. Исследовать влияние углеродных нанотрубок и наночастиц серебра в системе *in vitro* на жизнеспособность, фагоцитарную и цитокиновую активности иммунокомпетентных клеток.
4. Изучить влияние наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на изменение функциональной активности иммунокомпетентных клеток мышей при различных путях введения препаратов.
5. Оценить влияние ингаляционного введения мышам наночастиц серебра на уровень обсемененности легких *M.tuberculosis* у животных, больных хронической формой туберкулеза, а также изменение функциональной активности лейкоцитов.

Научная новизна

Выявлено, что ингаляционное применение наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, приводит к полной элиминации или значительному снижению концентрации возбудителя туберкулеза в легких экспериментальных животных.

Показано, что на 7 сут после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, мышам, больным хроническим туберкулезом, в сыворотке крови и бронхолегочном лаваже у животных отмечается увеличение концентрации интерферона-гамма (ИФН- γ) с последующим понижением уровня данного цитокина к 30 сут, что совпадает со снижением обсеменённости *M. tuberculosis* в органах мышей.

Обнаружено, что ингаляционное введение наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, здоровым мышам не вызывает изменения иммунологических показателей и патоморфологических нарушений в органах животных.

Установлено, что подкожное введение наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, в дозе 0,1 мг/кг снижает процентное содержание лимфоцитов в селезенке, увеличивает в 3,6 раза относительное количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и в 1,7 раза содержание ИФН- γ в сыворотке крови мышей.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан аэрозольный метод применения суспензии наночастиц серебра для снижения концентрации *M. tuberculosis* в легких больных хроническим туберкулезом животных, отраженный в Методических рекомендациях «Порядок работы с аэрозолями наночастиц и микроорганизмов (с использованием установки Глас-Кол модели 099С А4224) (Учрежденческий уровень внедрения)».

Выявлены новые свойства наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, (коммерческий препарат «Арговит»): бактерицидная активность против *M. tuberculosis* и иммуномодулирующее действие препарата на лимфоцитарное и фагоцитарное звенья иммунитета мышей. По материалам диссертации составлены Методические рекомендации «1.2.0052-11. Оценка воздействия наноматериалов на функцию иммунитета. Методические рекомендации – М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 – 42 с. (Федеральный уровень внедрения)».

Материалы диссертационной работы используются в курсе лекций «Основы общей токсикологии наноматериалов» по магистерской образовательной программе «Нанобиобезопасность» Пущинского государственного естественно-научного института (ПущГЕНИ) и в образовательной программе Московского физико-технического института (кафедра физико-технической информатики).

Методология и методы исследования

На первом этапе диссертационного исследования провели оценку физических параметров и бактерицидной активности наночастиц в экспериментах *in vitro*; на втором этапе изучили цитотоксическое воздействие наночастиц на иммунные клетки мышей в экспериментах *in vitro*; на третьем этапе исследовали воздействие наночастиц на иммунную систему мышей *in vivo* в зависимости от пути введения; на четвертом этапе изучили антибактериальное действие наночастиц серебра на модели больных хроническим туберкулезом мышей и провели оценку иммунного статуса данных лабораторных животных. В диссертационной работе использовали микробиологические, биологические, биохимические, иммунологические, микроскопические и гистологические экспериментальные методы исследования, а также методы статистической обработки результатов. Для проведения экспериментов, представленных в диссертационной работе, использовали следующее оборудование: многофункциональный анализатор Victor X3 2030, Perkin Elmer, Финляндия (программа WorkOut 2,5); проточный цитофлюориметр FACSCalibur, Becton Dickinson, США (программа CellQuest

Pro); электронный микроскоп «Hitachi» H-500, Япония (программа Image Scope M); сканирующий зондовый микроскоп «Smart SPM», АИСТ-НТ, Россия (программа Gwiddion); микротом «Reichert-Jung» (Германия); микроскоп Nikon Eclipse 80i (Япония); аэрозольную установку CO 099C A4224 (GLAS-COL APPARATUS, США); автоматический счетчик клеток CountessTM («Invitrogen», Корея).

Положения, выносимые на защиту

1. Бактерицидное и цитотоксическое действия углеродных нанотрубок и наночастиц серебра прямо пропорциональны концентрации наночастиц и зависят от их размера, формы и наличия поверхностного покрытия.

2. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, при введении мышам линии BALB/c ингаляционно или внутрижелудочно в дозе 0,1 мг/кг в течение одного месяца не оказывают токсического влияния на органы ретикуло-эндотелиальной системы.

3. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, при ингаляционном введении мышам линии C57Bl/6, больным хроническим туберкулезом, способствуют снижению обсемененности микобактериями или полной элиминации возбудителя туберкулеза из легких экспериментальных животных.

4. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, оказывают иммуномодулирующее действие при их введении мышам линий BALB/c или C57Bl/6, что выражается в изменении концентрации ИФН- γ и ФНО- α в биологических жидкостях животных.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов проведенных исследований подтверждается использованием современных методов исследования и оборудования, поверенного и сертифицированного надлежащим образом, с привлечением статистических методов обработки данных. Материалы диссертации представлены на Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010); Научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболensk, 2010); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика – 2010» (Москва, 2010); Fifth International Conference on Nanotechnology – Occupational and Environmental Health (США, 2011); 2-ой Международной школе по практической проточной цитометрии (Москва, 2011); VIII Междуна-

родной научно-практической конференции «Нанотехнологии – производству– 2012» (Фрязино, 2012); Объединенном Иммунологическом Форуме (Нижний Новгород, 2013); 6th International Symposium on Nanotechnology – Occupational and Environment Health (Япония, 2013).

Публикации. Основное содержание работы отражено в 11 публикациях, в том числе в трех статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и в 8 тезисах сообщений на научных конференциях.

Личный вклад соискателя. Планирование, организация, проведение экспериментов и исследований на лабораторных животных, выполнение исследований методами цитометрии, иммуноферментного анализа, атомно-силовой микроскопии, спектрофотометрии, хемилюминесценции, статистическая обработка полученных данных и их интерпретация проведены лично автором под руководством к.б.н. Фирстовой В.В. и д.б.н. Потапова В.Д. Все изложенные в диссертации материалы получены непосредственно самим соискателем, или при его участии. Результаты, описанные в отдельных главах, получены в соавторстве с сотрудниками лаборатории аэриобиологических испытаний: н.с. Грищенко Н.С., н.с. Рудницкой Т.И.; отдела иммунобиохимии: н.с. Ганиной Е.А.; лаборатории электронной микроскопии: зав. лабораторией д.б.н. Герасимовым В.Н.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 149 страницах, иллюстрированы 22 рисунками и 14 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 206 цитируемых работы, из которых 22 российских и 184 зарубежных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические методы

Микроорганизмы. В работе использовали штаммы *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv («ГКПМ – Оболенск» В-4825), *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ («ГКПМ – Оболенск» В-4341), *Salmonella* Enteritidis 4412 («ГКПМ – Оболенск» В-7844). Культивирование *S. Enteritidis* 4412 проводили на плотной питательной среде ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ), *F. tularensis* 15 НИИЭГ – на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ), *M. tuberculosis* H37Rv – на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 AgarBase (HiMedia, Индия).

Определение бактерицидной эффективности наночастиц *in vitro* в концентрациях 50; 25; 10; 1; 0,25 и 0,1 мг/л проводили на штаммах *S. Enteritidis* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *M. tuberculosis* H37Rv («ГКПМ – Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ) суспензионным методом (МУ 3.5.2596-10).

Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. tuberculosis* H37Rv в органах зараженных животных проводили высевом гомогенатов органов методом 10-кратных разведений в забуференном физиологическом растворе на плотную питательную среду Middelbrook 7H11 (Himedia, Индия). Учет колоний проводили на 28 сут.

Изучение действия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57Bl/6 проводили в аэрозольной камере CO 099C A4224 (GLAS-COL APPARATUS, США). Препарат наночастиц серебра в дозе 0,1 мг на 1 кг массы тела животного вводили однократно ингаляционным способом. Микробиологические высевы из легких и селезенки проводили на 1, 10 и 30 сут после введения.

Биотехнологические методы

Наночастицы. В работе использовали три вида наночастиц: 1. НЧС-ПВП – водная дисперсия наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярным полимером медицинского назначения поливинилпирролидоном (ПВП) (препарат «Арговит», ООО НПЦ «Вектор-Вита», Россия). 2. НЧС – коллоидный раствор наночастиц серебра в воде (Plasma Chem, Германия). 3. УНТ – углеродные однослойные нанотрубки (Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, РАН, Новгород, Россия).

Биологические методы

Лабораторные животные. В работе использовали мышей линии BALB/c и C57Bl/6, самки в возрасте 7-8 недель, весом 18-20 г. («Научный центр биомедицинских технологий», Андреевка, Россия).

Обработка мышей наночастицами. НЧС-ПВП и УНТ вводили животным подкожно, внутрижелудочно или ингаляционно в дозах 0,1 мг наночастиц на 1 кг массы тела на протяжении 28 дней ежедневно. Ингаляционное введение осуществляли в аэрозольной установке CO 099C A4224 (GLAS-COL APPARATUS, США) в течение 20 мин в день.

Мышиная модель экспериментального хронического туберкулеза. Заражение мышей линии C57Bl/6 осуществляли введением 0,2 мл суспензии клеток штамма

M. tuberculosis H37Rv внутривнутрино в дозе 5×10^4 КОЕ/животное. Через 4 месяца животных эвтаназировали ингаляцией CO_2 , затем провели некропсию органов для микробиологических исследований.

Иммунологические методы

Первичные клеточные культуры. В работе использовали мышинные спленоциты и фагоциты (нейтрофилы и макрофаги) перитонеального экссудата, которые выделяли в ходе эксперимента общепринятыми методами (Coligan E.J., 2005).

Цитотоксичность наночастиц выявляли в МТТ-тесте (Mosmann T., 1983). Измерение оптической плотности растворов проводили при длине волны 595 нм на многоканальном спектрофотометре Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия).

Уровень продукции активных форм кислорода фагоцитами определяли методом хемилюминесценции (ХЛ). В каждую лунку 96-луночного планшета вносили суспензию нейтрофилов (5×10^6 кл/мл), для усиления ХЛ применялся раствор люминола с концентрацией $5,6 \times 10^{-4}$ М (BioChemika, Чехия). В качестве индуктора фагоцитоза использовали опсонизированный зимозан («Sigma», США). Значение ХЛ измеряли 6 раз (длительность одного измерения 10 мин) на приборе Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия) при 37 °С.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов и количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов селезенки проводили методами проточной цитофлюориметрии. Спленоциты (5×10^6 кл/мл) опытных и контрольных групп мышей окрашивали моноклональными антителами CD3 PerCP, CD4 APC, CD8 PE, CD19 APC, IFN- γ FITC и TNF- α APC (eBioscience, США) в течение 20 мин в темноте при 20 °С в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере и фиксировали 1 % раствором формалина. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Процентное содержание субпопуляций клеток в образцах определяли с использованием программы «CellQuest Pro».

Определение количества ИФН- γ и ФНО- α в надосадочной жидкости спленоцитов мышей, в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважжа проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Mouse IFN- γ ELISA» и «Mouse TNF- α ELISA» (Bender MedSystems, Австрия) в соответствии с руководством производителя. Оптическую плотность измеряли на планшетном мно-

гофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 450 нм.

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

Гистологические методы исследования органов мышей: легких, печени, почек, селезенки, паховых лимфатических узлов, окрашенных гематоксилин-эозином после обезвоживания и парафинирования и заключенных в бальзам, проводили на микроскопе Nikon Eclipse 80i (Япония), оснащенном цифровой камерой Nikon DS-U2.

Микроскопические методы

Определение физических параметров (форма, размер) наночастиц проводили методами просвечивающей электронной микроскопии (с помощью электронного микроскопа «Hitachi» H-500, Япония) с использованием техники негативного контрастирования при ускоряющем напряжении 75 кВ; и атомно-силовой микроскопии с помощью сканирующего зондового микроскопа «Smart SPM» («АИСТ-НТ», Россия) с использованием программы «Gwiddion».

Методы статистической обработки результатов

Количественные значения результатов экспериментов подвергали статистической обработке с помощью пакета офисных программ Microsoft Office Excel 2007. Достоверность различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия между группами признавали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика наночастиц серебра и углеродных нанотрубок и изучение их бактерицидной активности в экспериментах *in vitro*

Результаты анализа микрофотографий НЧС-ПВП и НЧС позволили заключить, что данные наночастицы представлены частицами округлой формы. Средний диаметр НЧС-ПВП составил $(43,6 \pm 10,7)$ нм, НЧС – $(10,3 \pm 5,6)$ нм. УНТ имели диаметр $(36,2 \pm 4,8)$ нм. Наибольшей способностью к агрегации обладали УНТ, что отражалось в образовании ими крупных агрегатов трубчатой формы. Меньше агрегировали НЧС. НЧС-ПВП были равномерно распределены в препарате (рис. 1).

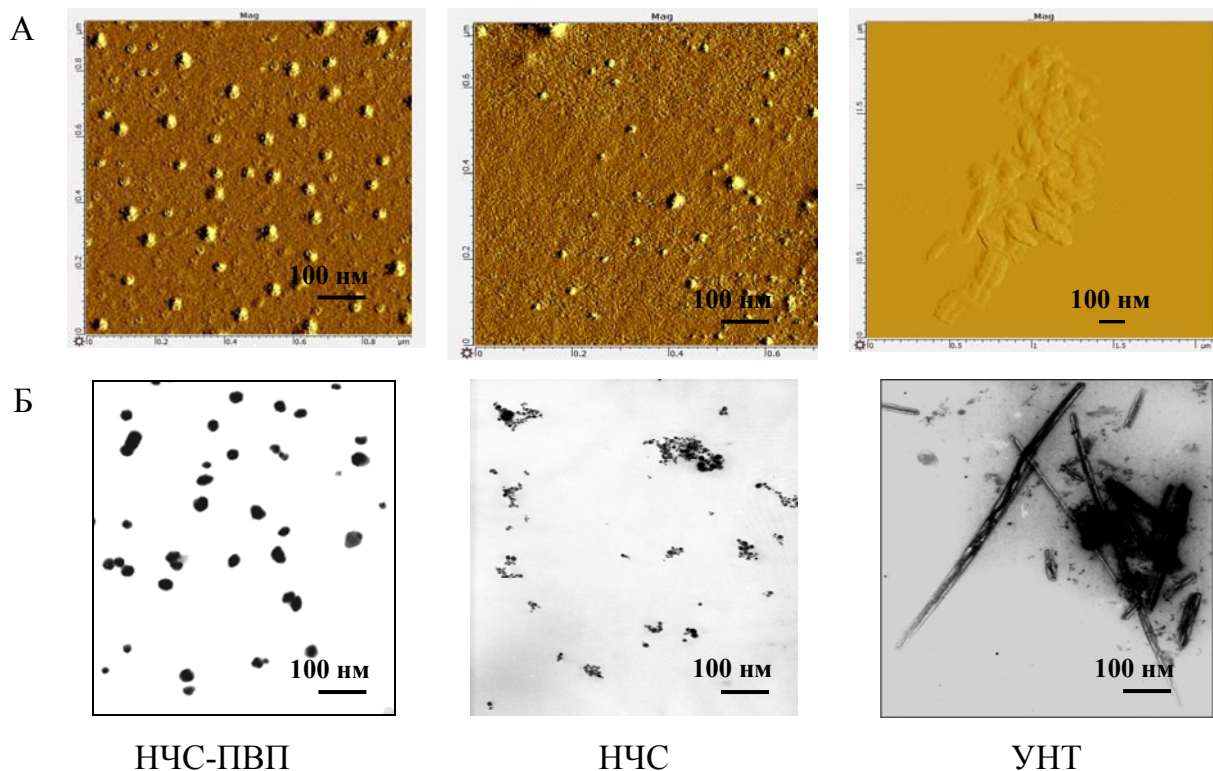


Рисунок 1-Микрофотографии наночастиц, полученные на атомно-силовом «Smart SPM» «АИСТ-НТ» (Россия) (А) и электронном «Hitachi» Н-500 (Япония) (Б) микроскопах

Изучение бактерицидной активности наночастиц проводили в отношении штаммов: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Salmonella Enteritidis* 4412. Выявили, что НЧС-ПВП проявляли наибольшую бактерицидную активность в отношении всех бактериальных штаммов по сравнению с НЧС и УНТ. Бактерицидная активность наночастиц в отношении *M.tuberculosis* H37Rv представлена в табл. 1.

Таблица 1 – Бактерицидная эффективность наночастиц в отношении *M.tuberculosis* H37Rv (%)*.

Штамм	Концентрация наночастиц, мг/л				
	50	25	10	1	0,1
НЧС-ПВП	55,12±4,51	36,25±2,83	31,15±2,55	3,53±0,29	2,42±0,21
НЧС	30,61±4,31	24,23±2,45	20,04±2,17	8,56±0,96	0
УНТ	21,27±2 97	17,53±2,63	9,62±2,23	4,47±1,26	0

Примечание – * – Бактерицидную эффективность рассчитывали по показателям погибших КОЕ относительно контроля (образца без добавления НЧС-ПВП) в процентном соотношении.

Изучение воздействия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на иммунные клетки в экспериментах *in vitro*

Результаты МТТ-теста показали, что наименьшее цитотоксическое воздействие на митохондриальную активность перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и спленоцитов оказывали НЧС-ПВП, а наиболее цитотоксичными оказались НЧС. Цитотоксические свойства УНТ проявлялись в концентрациях, превышающих 5 мг/л (рис. 2).

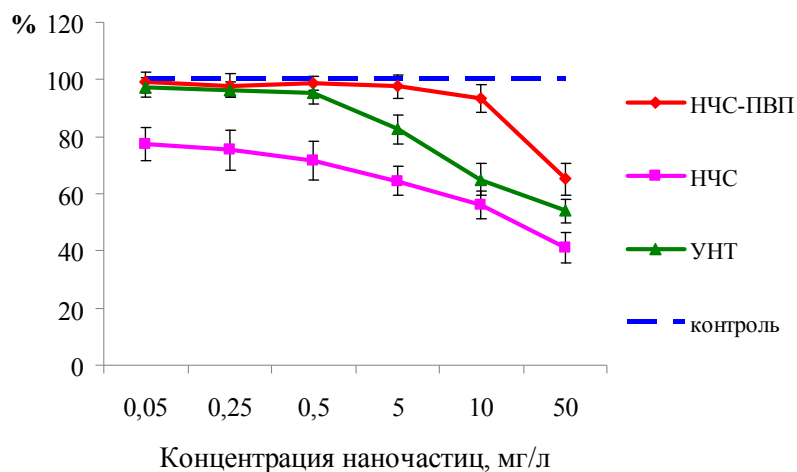


Рисунок 2 - Уровень активности митохондриальных дегидрогеназ перитонеальных макрофагов мышей после 24 ч инкубации в присутствии изучаемых наночастиц в МТТ-тесте. Контроль – интактные клетки

Уровень продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами в присутствии всех изученных наночастиц при низкой концентрации (10 мг/л) не отличался от уровня контрольных значений. НЧС в дозе 100 мг/л увеличивали продукцию АФК нейтрофилами мыши в 3,75 раза, что может быть причиной окислительного стресса в клетках (рис. 3).

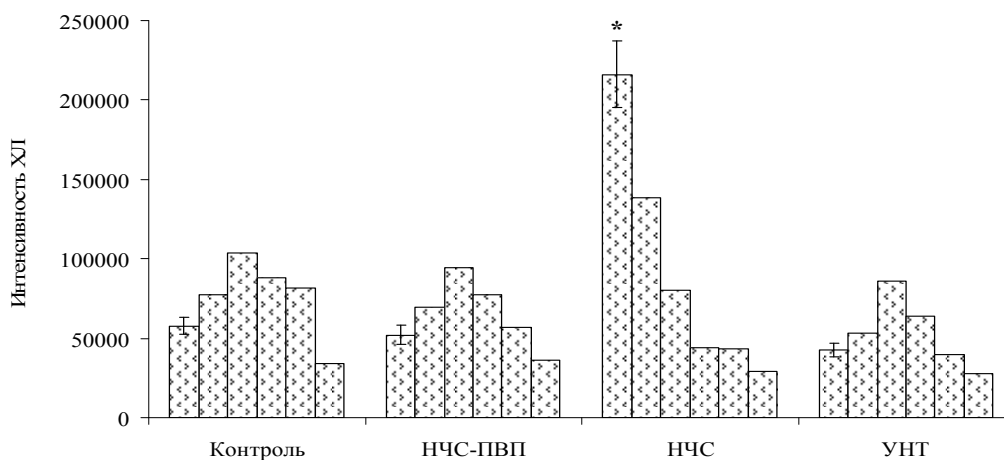


Рисунок 3 - Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей в присутствии наночастиц в концентрации 100 мг/л. Контроль – интактные клетки. * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P \leq 0,001$)

Продукция АФК нейтрофилами в ответ на зимозан, опсонизированный мышиной сывороткой, моделирует ответ фагоцитов на чужеродный патоген и отражает бактерицидный потенциал нейтрофилов. Уровень продукции АФК нейтрофилов в ответ на зимозан, в присутствии НЧС-ПВП в концентрации 100 мг/л не отличался от контрольных клеток. НЧС и УНТ (100 мг/л) снижали уровень индукции АФК нейтрофилами в присутствии зимозана в 4 и 5,8 раз, соответственно ($P \leq 0,001$), по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении бактерицидного потенциала нейтрофилов (рис. 4).

Цитотоксичность НЧС без покрытия может быть опосредована через окислительный стресс, в то время как НЧС, покрытые ПВП, способны вызывать цитотоксические эффекты через воспалительные пути увеличением продукции цитокинов (Nguyen, 2013). Поэтому для исключения, возможно, другого механизма цитотоксичности НЧС-ПВП провели эксперименты по изучению его влияния на продукцию провоспалительных цитокинов спленоцитами мышей. Добавление к спленоцитам НЧС-ПВП в концентрациях от 0,5 мг/л до 50 мг/л не влияло на выработку ИФН- γ и ФНО- α лимфоцитами *in vitro*, что позволило заключить об отсутствии инициации провоспалительного ответа иммунных клеток.

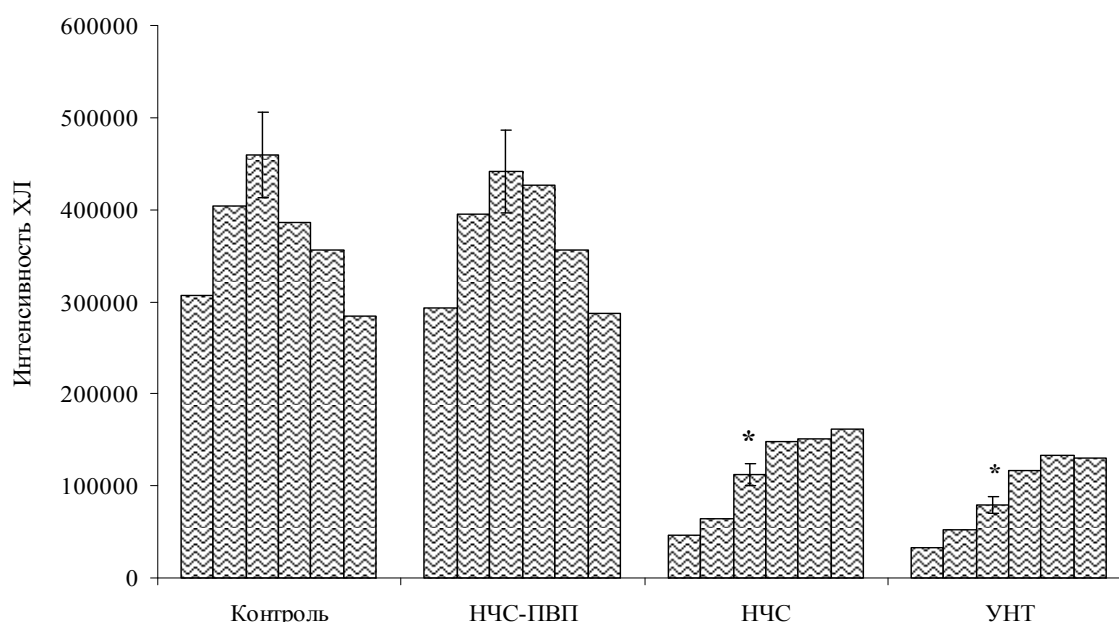


Рисунок 4 - Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей в ответ на добавление зимозана в присутствии наночастиц в концентрации 100 мг/л. Контроль – интактные клетки. * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P \leq 0,001$)

Изучение воздействия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на иммунную систему мышей в зависимости от пути введения

На следующем этапе изучили многократное воздействие НЧС-ПВП и УНТ при ингаляционном, подкожном или внутрижелудочном введении животным. Гистологическое исследование легких, печени, почек, селезенки, паховых лимфатических узлов мышей линии BALB/c после ингаляционного и внутрижелудочного введения наночастиц серебра в течение 28 дней не показало наличия в них патологических изменений. Подкожное введение НЧС-ПВП приводило к изменению состава иммунокомпетентных клеток в селезенке, печени и паховых лимфатических узлах, а также гиперплазии красной пульпы селезенки, увеличению количества активированных макрофагов и гнездных скоплений полиморфноядерных лейкоцитов, интенсивной лимфоцитарной инфильтрации, что является показателем активации иммунокомпетентных клеток организма животного (рис. 5).

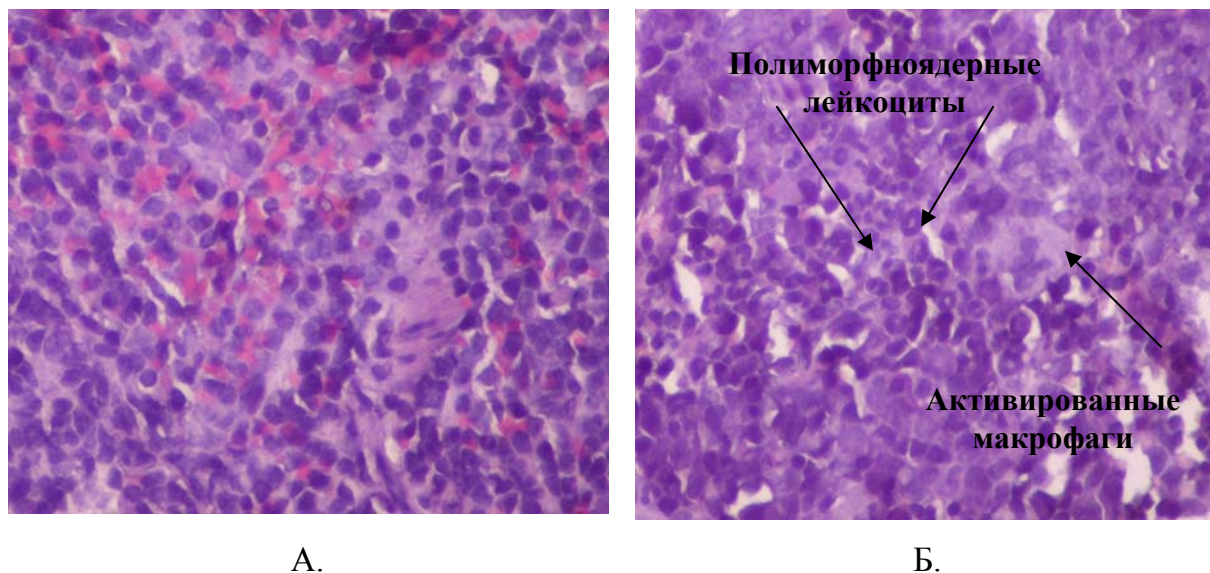


Рисунок 5 - Красная пульпа селезенки мыши после подкожного введения физиологического раствора (А) и НЧС-ПВП (Б). А. Преобладание лимфоцитов. Б. Обширное скопление полиморфноядерных лейкоцитов на фоне активированных макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$

При введении НЧС-ПВП мышам жизнеспособность спленоцитов, полученных от животных всех экспериментальных групп, достоверно не отличалась и составляла в среднем $(94,26 \pm 4,47) \%$. При ингаляционном и внутрижелудочном введении НЧС-ПВП соотношение Т- и В-лимфоцитов, содержание ИФН- γ и ФНО- α -продуцирующих Т-лимфоцитов не отличались от контрольных показателей, а после подкожного введения отмечали снижение относительного количества В-лимфоцитов в селезенке жи-

вотных до $(33,84 \pm 2,4) \%$ по сравнению с контролем $((50,26 \pm 1,6) \%)$ и наблюдали тенденцию к снижению содержания Т-лимфоцитов (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей, %

Способ введения НЧС-ПВП	Т-лимфоциты	Т-хелперы	Цитотоксические лимфоциты	В-лимфоциты
Ингаляционный	$31,99 \pm 3,7$	$20,04 \pm 2,5$	$9,33 \pm 1,2$	$40,06 \pm 2,6$
Подкожный	$24,22 \pm 1,4$	$12,97 \pm 2,1$	$7,20 \pm 0,6$	$33,84 \pm 2,4$
Внутрижелудочный	$32,24 \pm 3,2$	$19,38 \pm 1,6$	$8,57 \pm 1,4$	$44,32 \pm 1,8$
Контроль	$30,56 \pm 2,8$	$18,56 \pm 1,2$	$9,77 \pm 0,8$	$50,26 \pm 1,6$

При подкожном способе введения НЧС-ПВП мышам содержание ИФН- γ - продуцирующих Т-лимфоцитов возрастало в 3,6 раза $((30,63 \pm 6,4) \%)$ по сравнению с контролем $((8,38 \pm 4,8) \%)$ ($P \leq 0,05$). В сыворотке крови при подкожном способе введения НЧС-ПВП также увеличивалось содержание ИФН- γ до $(125 \pm 9,2)$ пг/мл относительно контрольной группы животных $((74,5 \pm 6,4)$ пг/мл) ($P \leq 0,05$). Одним из критериев развития воспаления при ингаляционном введении препарата может быть увеличение белка в жидкости бронхо-легочного лаважа (БЛЛ). При ингаляционном введении НЧС-ПВП мышам достоверного увеличения количества белка в жидкости БЛЛ не обнаружили. При введении животным ПВП различными способами изменений иммунологических показателей и морфологической структуры органов не обнаружили.

Гистологическое исследование органов мышей после многократного ингаляционного воздействия углеродных нанотрубок показало, что изменения патологического характера ограничены местом введения (легкими) и проявляются преимущественно диффузным утолщением межальвеолярных перегородок и образованием обширных гранул из эпителиоидных клеток. Также выявили увеличение количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа до $(1380,2 \pm 151,6)$ мг/л по сравнению с контролем $((660,4 \pm 94,8)$ мг/л) ($P \leq 0,05$), что свидетельствует о воспалительном процессе в легких. Ингаляционное введение углеродных нанотрубок снижало на 30 % количество жизнеспособных клеток в селезенке экспериментальных мышей. При этом наблюдали тенденцию к увеличению процентного содержания Т-лимфоцитов в селезенке $((40,66 \pm 2,3) \%)$, в равной степени за счет Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. Хотя достоверного изменения относительного количества ИФН- γ - и ФНО- α - продуцирующих Т-клеток в селезенке животных не выявили.

Изучение антибактериального действия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на модели хронического туберкулеза мышей линии С57В1/6

Учитывая высокую бактерицидную активность НЧС-ПВП в отношении *M. tuberculosis* в экспериментах *in vitro* и отсутствие иммунопатологических изменений у экспериментальных животных при ингаляционном введении данных наночастиц, на следующем этапе оценили влияние НЧС-ПВП на обсемененность легких и селезенок микобактериями у хронически больных туберкулезом мышей линии С57В1/6. Микробиологические высевы показали выраженное снижение обсемененности органов бактериями *M. tuberculosis* у больных туберкулезом мышей после их ингаляционной обработки НЧС-ПВП: из органов высевались единичные колонии, либо *M. tuberculosis* полностью отсутствовали (рис. 6).

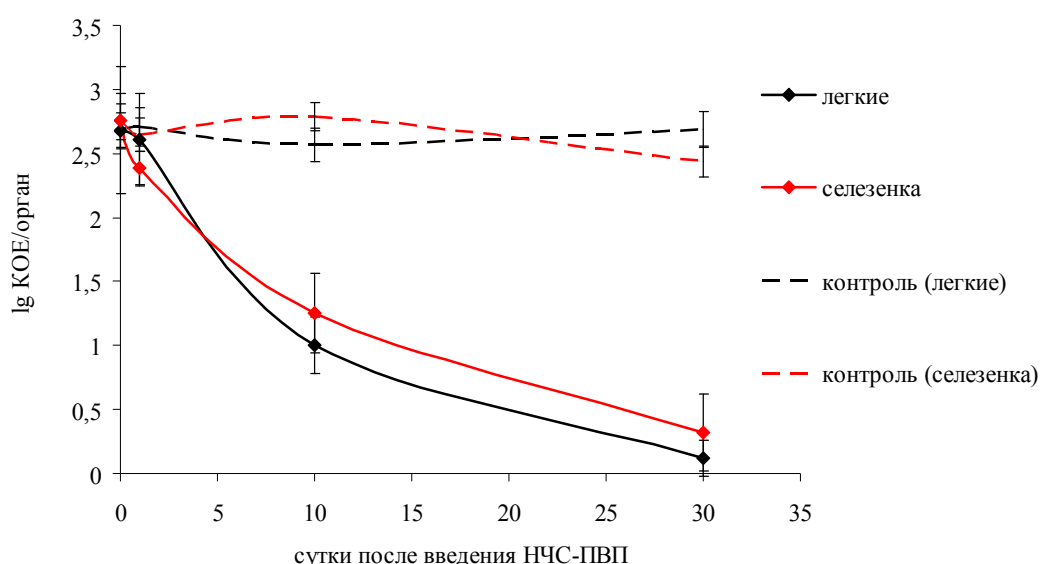
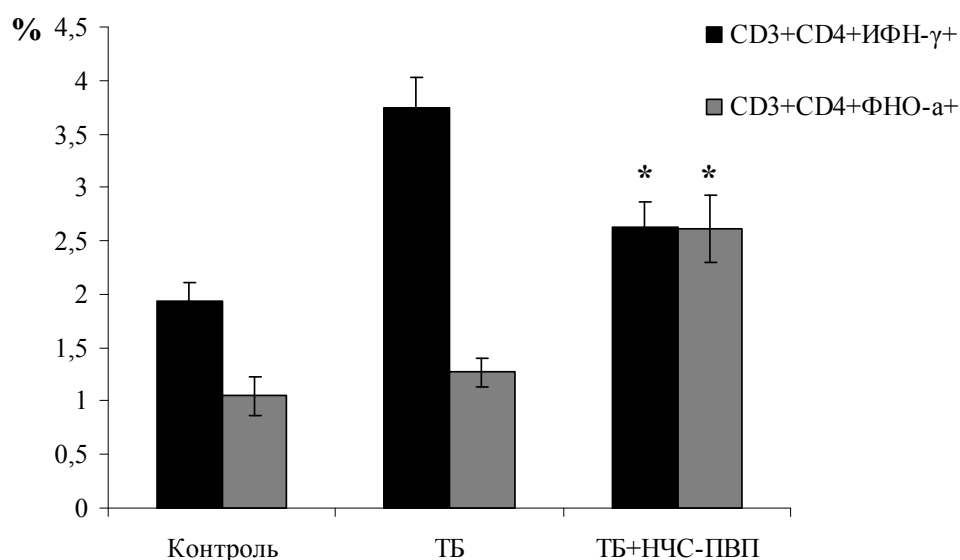


Рисунок 6 - Динамика снижения обсемененности органов *M. tuberculosis* у мышей, больных хроническим ТБ, в течение месяца после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП. Контроль – обсемененность органов *M. tuberculosis* в течение месяца в группе мышей, больных хроническим ТБ, без введения НЧС-ПВП

Оценка иммунологических показателей больных хроническим туберкулезом мышей после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном

Провели оценку соотношения основных субпопуляций лимфоцитов, способность лимфоцитов к продукции цитокинов (количество ИФН- γ - и ФНО- α – продуцирующих Т-лимфоцитов), содержание цитокинов в биологических жидкостях, количество белка в жидкости бронхо-легочного лаважа и бактерицидный потенциал фагоцитов.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов у мышей с хронической формой ТБ показала увеличение содержания Т-лимфоцитов на 5,77 % ($P \leq 0,05$) и снижение содержания В-лимфоцитов на 8,27 % ($P \leq 0,05$). После введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам относительное количество Т- и В-лимфоцитов достоверно не отличалось от значений данных показателей в контрольной группе животных. Увеличенное в 2 раза содержание ИФН- γ -продуцирующих Т-хелперов в селезенках больных ТБ мышей снижалось после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП. Относительное количество ФНО- α -продуцирующих Т-хелперов в группах здоровых и больных ТБ мышей достоверно не отличалось друг от друга. Ингаляционное воздействие НЧС-ПВП приводило к увеличению содержания ФНО- α -продуцирующих Т-хелперов в селезенках больных ТБ мышей в 2 раза ($P \leq 0,05$) (рис. 7).



*Рисунок 7 - Содержание цитокинпродуцирующих Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) в селезенке мышей. Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P \leq 0,05$)*

Оценка динамики изменения содержания ИФН- γ в сыворотке крови мышей показала достоверное увеличение количества данного цитокина на 7 сут после воздействия с последующим его снижением к 30 сут (но достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ) (рис. 8). Известно, что у больных активной формой туберкулеза уровень ИФН- γ в крови может быть снижен или повышен по сравнению со здоровыми лицами, а лечение туберкулеза сопровождается повышением сывороточного уровня ИФН- γ (Лядова, 2009).

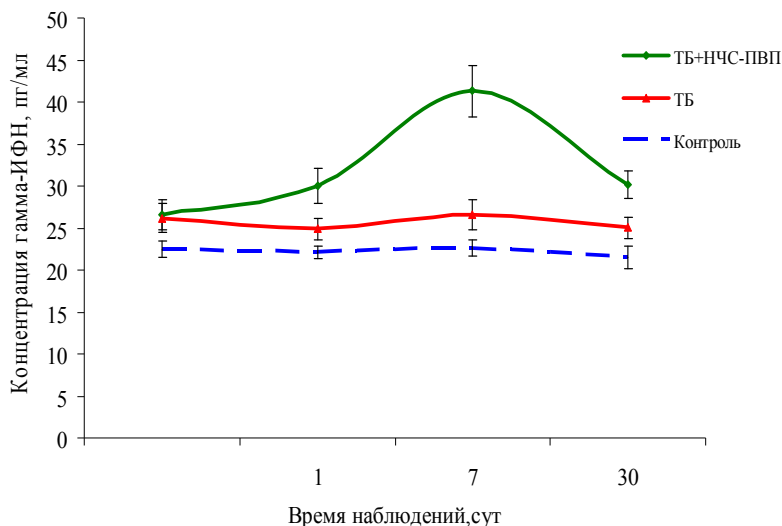


Рисунок 8 - Динамика изменения содержания ИФН- γ в сыворотке крови мышей в течение месяца

Контроль – здоровые мыши, ТБ – больные ТБ мыши, ТБ+НЧС-ПВП – больные ТБ мыши после введения НЧС-ПВП

В жидкости бронхо-легочного лаважа (БЛЛ) больных ТБ мышей на 7 сут после введения НЧС-ПВП также наблюдали значительное увеличение содержания гамма-интерферона до значения $(85,00 \pm 5,68)$ пг/мл по сравнению с уровнем данного цитокина до введения НЧС-ПВП $((50,01 \pm 3,33)$ пг/мл, $P \leq 0,05$). Через 30 сут после введения НЧС-ПВП уровень гамма-ИФН снижался и был достоверно ниже данного показателя в группе больных ТБ мышей ($P \leq 0,05$) (рис. 9).

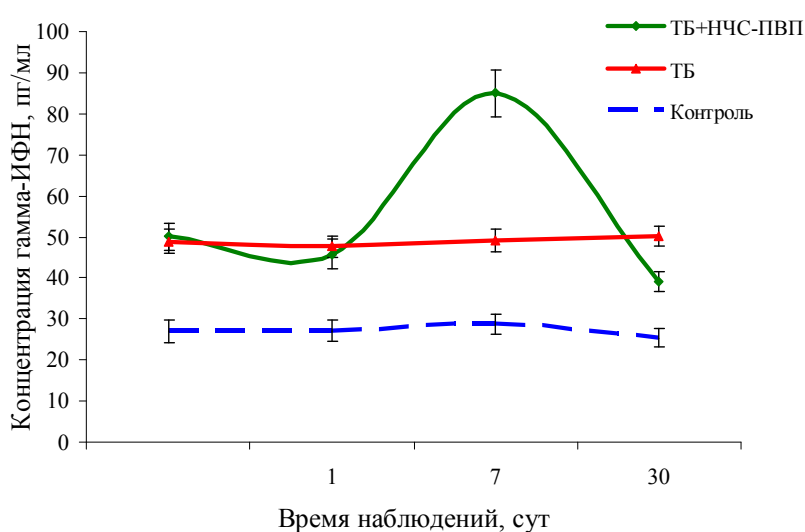


Рисунок 9 - Динамика изменения содержания ИФН- γ в жидкости БЛЛ мышей в течение месяца

Контроль – здоровые мыши, ТБ – больные ТБ мыши, ТБ+НЧС-ПВП – больные ТБ мыши после введения НЧС-ПВП

Повышенное содержание ФНО- α в сыворотке крови и жидкости БЛЛ больных ТБ мышей через 30 сут после введения НЧС-ПВП снижалось в 2,3 и 2 раза, соответственно. У больных ТБ мышей наблюдали значительное увеличение содержания интерлейкина-4 (ИЛ-4) в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ в 6 и 17 раз, соответственно, относительно значений данных показателей в контрольной группе $((3,67 \pm 0,72)$ и $(4,12 \pm 0,64)$ пг/мл, $P \leq 0,001$). Через 30 сут после введения НЧС-ПВП у мышей, больных ТБ, уровень ИЛ-4 достоверно не отличался от содержания данного цитокина в исследованных биологических жидкостях животных контрольной группы.

У мышей, больных ТБ, наблюдали повышение содержания белка в жидкости бронхо-легочного лаважа до $(3826,8 \pm 215,3)$ мг/л по сравнению с таковым показателем в контрольной группе животных $(926,7 \pm 76,3)$ мг/л (увеличение в 4 раза) ($P \leq 0,001$). После воздействия НЧС-ПВП количество белка в жидкости БЛЛ больных ТБ мышей снижалось в два раза до показателя $(1908,5 \pm 105,7)$ мг/л ($P \leq 0,001$), что отражало уменьшение воспаления в легких. У здоровых животных ингаляционное введение НЧС-ПВП достоверно не изменяло количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа.

Интенсивность продукции АФК нейтрофилами больных ТБ мышей была снижена по сравнению со значениями данного показателя в группе контрольных животных ($P \leq 0,001$). Через 30 сут после ингаляционного введения НЧС-ПВП наблюдали увеличение в 2,5 раза уровня продукции АФК нейтрофилами больных ТБ мышей ($P \leq 0,001$) (рис. 10), что отражает усиление бактерицидного потенциала данных клеток, играющего ключевую роль в иммунопатогенезе туберкулеза.

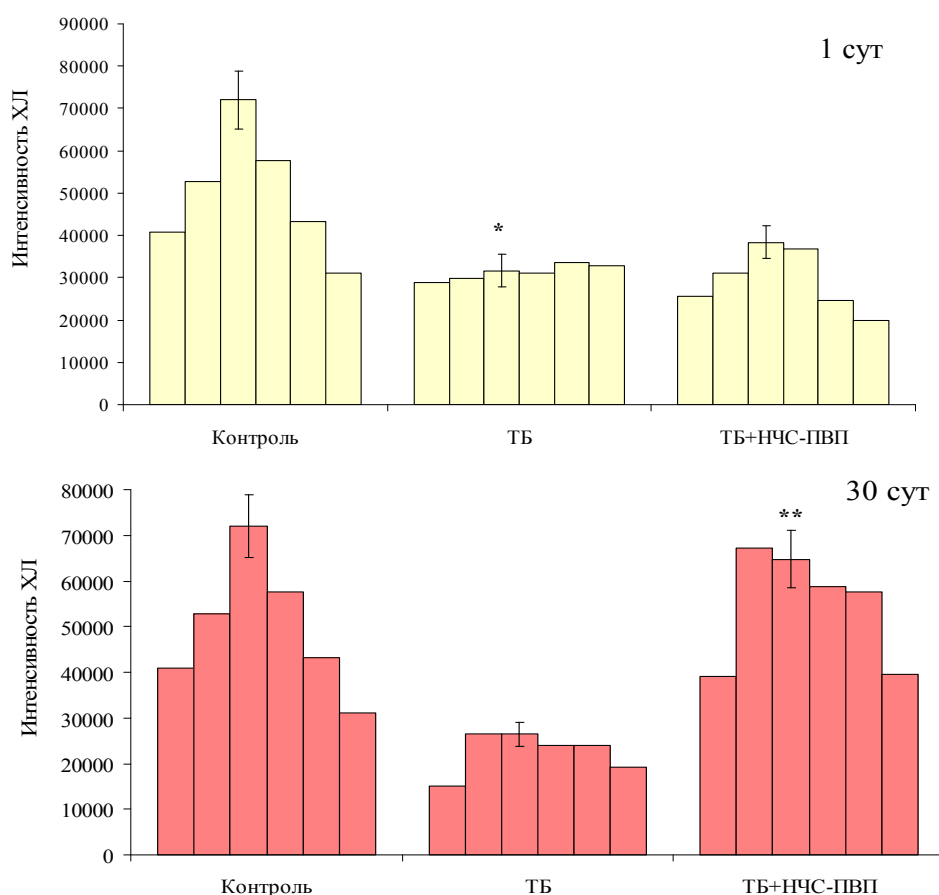


Рисунок 10 - Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей. Контроль – здоровые мыши; ТБ – больные ТБ мыши; ТБ+НЧС-ПВП – больные ТБ мыши после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P \leq 0,001$); ** – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P \leq 0,001$)

ВЫВОДЫ

1. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, и наночастицы серебра без покрытия характеризуются устойчивостью к агрегации и гомогенно распределяются в растворе. Углеродные нанотрубки формируют в растворе агрегаты.

2. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, обладают выраженным бактерицидным эффектом по отношению к микроорганизмам *M. tuberculosis* H37Rv, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *S. Enteritidis* 4412. Наночастицы серебра без покрытия характеризуются менее выраженной бактерицидной активностью, а углеродные нанотрубки практически не оказывают бактерицидного действия на исследуемые патогены.

3. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, в концентрациях от 0,05 до 50 мг/л не оказывают цитотоксического действия на иммунокомпетентные клетки мышей *in vitro*. Наночастицы серебра без покрытия и углеродные нанотрубки снижают жизнеспособность и функциональную активность иммунных клеток.

4. Многократное ингаляционное и внутрижелудочное введение наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, мышам линии BALB/c в дозе 0,1 мг/кг не изменяет функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Подкожное введение наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, в дозе 0,1 мг/кг вызывает изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, увеличивает количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке в 3,6 раза по сравнению с контролем, а также повышает содержание ИФН- γ в сыворотке крови мышей до $(125 \pm 9,2)$ пг/мл по сравнению с контролем $((74,5 \pm 6,4)$ пг/мл).

5. Установлен противотуберкулезный эффект наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном: ингаляционное введение данных наночастиц мышам, больным туберкулезом, обеспечивало снижение обсемененности органов *M. tuberculosis* на два порядка до полной элиминации бактерий у отдельных животных. Показано, что на 30 сут после введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, больным туберкулезом мышам наблюдается снижение количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа в два раза, восстановление баланса цитокинов и соотношения популяций лимфоцитов в селезенке, а также усиление бактерицидного потенциала нейтрофилов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах, определенных ВАК

1. Фирстова, В.В. Влияние углеродных нанотрубок на жизнеспособность спленоцитов и субпопуляционный состав лимфоцитов мышей линии BALB/C в зависимости от пути их проникновения в организм / В.В. Фирстова, В.Д. Потапов, В.Н. Герасимов, **О.В. Полежаева***, Е.В. Зырина // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5 (218). – С. 40-43.

2. **Калмантаева, О.В.** Особенности воздействия наночастиц серебра на иммунную систему мышей в зависимости от пути введения / **О.В. Калмантаева**, В.В. Фирстова, В.Д. Потапов, Е.В. Зырина, В.Н. Герасимов, Е.А. Ганина, В.А. Бурмистров, А.В. Борисов // Российские нанотехнологии. – 2014. – Т. 9, № 9-10. – С. 78-82. (Импакт-фактор ISI/РИНЦ–1,137) Англ. издание: **Kalmantaeva, O.V.** Silver-Nanoparticle Exposure on Immune System of Mice Depending on the Route of Administration / **O.V. Kalmantaeva**, V.V. Firstova, V.D. Potapov, E.V. Zyrina, V.N. Gerasimov, E.A. Ganina, V. A. Burmistrov, A.V. Borisov // Nanotechnologies in Russia. – 2014. – Vol. 9, N. 9-10. – P. 571-576 (Scopus SJR – 0,229).

3. Фирстова, В.В. Использование методов цитометрии для оценки специфического клеточного иммунитета / В.В. Фирстова, **О.В. Калмантаева**, П.Х. Копылов, А.А. Горбатов, В.М. Павлов, С.А. Иванов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (2). – С. 120-122.

Тезисы докладов на научных конференциях

4. **Полежаева, О.В.** Влияние углеродных нанотрубок в составе аэрозоля на течение хронического туберкулеза у мышей, зараженных штаммом H37RV / **О.В. Полежаева**, В.Д. Потапов, В.В. Фирстова, Н.С. Грищенко, В.В. Мочалов // Материалы 14 Международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» – Пущино, 2010.

5. **Полежаева, О.В.** Анализ интегральной токсичности наноматериалов в модельных условиях / **О.В. Полежаева**, А.С. Бутыркина, Е.В. Зырина, В.Н. Герасимов, В.В. Фирстова, И.В. Бахтеева, Г.М. Титарева, В.Д. Потапов // Современные технологии обеспечения биологической безопасности. Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. – Оболенск, 2010. – С. 92-95.

6. Фирстова, В.В. Оценка биобезопасности применения наносеребра в разных формах / В.В. Фирстова, **О.В. Полежаева**, В.Д. Потапов, Г.М. Титарева, И.В. Бахтеева // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010». – 2010. – Т. 4. – С. 444-446.

7. Firstova, V.V. Cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes depend on the route of administration / V.V. Firstova, **O.V. Polezhaeva**, V.N. Gerasimov, V.D. Potapov // Fifth International Conference on Nanotechnology – Occupational and Environmental Health. – USA, 2011. – P. 209.

8. **Полежаева, О.В.** Применение метода проточной цитофлюориметрии для оценки иммунобиологических свойств углеродных нанотрубок / **О.В. Полежаева**, Е.В. Зырина, В.В. Фирстова // Сборник тезисов 2-ой Международной школы по практической проточной цитометрии. – Москва, 2011. – С. 77-78.

9. **Калмантаева, О.В.** Влияние наночастиц серебра на продукцию активных форм кислорода фагоцитирующими клетками мышей / **О.В. Калмантаева**, В.В. Фирстова, В.Д. Потапов, Н.С. Грищенко, В.Н. Герасимов // Тезисы докладов VIII Международной научно-практической конференции «Нанотехнологии – производству». – Фрязино, 2012. – С. 11-12.

10. **Калмантаева, О.В.** Изучение антимикробных свойств наночастиц серебра и их влияния на цитокиновый ответ Т-лимфоцитов мышей линии C57Bl с хроническим течением туберкулеза / **О.В. Калмантаева**, Е.В. Зырина, В.В. Фирстова, Н.С. Грищенко, В.Д. Потапов // Российский иммунологический журнал. – 2013. – Т. 7 (16), № 2-3. – С. 248.

11. Firstova, V.V. Toxicity of silver nanoparticles and their routes of exposures / V.V. Firstova, **O.V. Kalmantaeva**, E.Yu. Zyrina, T.Yu. Zavistyaeva, V.D. Potapov // 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environment Health. – Япония, 2013. – P. 75.

* Фамилия Калмантаевой О.В. до 2011 года.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АФК	активные формы кислорода
БЛЛ	бронхо-легочный лаваж
ГКПМ – Оболенск	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур – Оболенск
ИЛ-4	интерлейкин 4
ИФН- γ	интерферон-гамма
НЧС	наночастицы серебра
НЧС-ПВП	наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном
ПВП	поливинилпирролидон
ТБ	туберкулез
УНТ	углеродные нанотрубки
ФНО- α	фактор некроза опухоли-альфа
ХЛ	хемилюминесценция