

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

На правах рукописи

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)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Фирстова Виктория Валерьевна,
кандидат биологических наук

Научный консультант:
Потапов Василий Дмитриевич,
доктор биологических наук

Оболенск-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Туберкулез	14
1.1.1. Иммунопатогенез туберкулеза	15
1.1.2. Основные принципы лечения туберкулеза	18
1.2. Использование наночастиц в медицине	20
1.2.1. Углеродные нанотрубки	21
1.2.2. Наночастицы серебра	25
1.3. Токсичность наночастиц серебра	30
1.3.1. Свойства наночастиц серебра, определяющие токсичность	30
1.3.2. Токсикодинамика наночастиц серебра	36
1.3.3. Токсикокинетика наночастиц серебра	39
1.3.4. Иммунотоксичность наночастиц серебра	42
1.4. Заключение по обзору литературы	45
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. Микробиологические методы.....	47
2.1.1. Штаммы микроорганизмов	47
2.1.2. Среды и условия культивирования микроорганизмов	47
2.1.3. Определение бактерицидной эффективности наночастиц <i>in vitro</i>	48
2.1.4. Определение обсемененности органов животных <i>M. tuberculosis</i>	49
2.1.5. Изучение действия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирро- лидоном, на модели хронического туберкулеза у мышей линии C57Bl/6.....	49
2.2. Биотехнологические методы.....	49
2.2.1. Наночастицы серебра.....	49
2.2.2. Углеродные нанотрубки.....	50

2.3. Биологические методы	50
2.3.1. Лабораторные животные	50
2.3.2. Обработка мышей наночастицами	51
2.3.3. Мышиная модель экспериментального хронического туберкулеза	51
2.4. Гистологические методы.....	52
2.5. Иммунологические методы	52
2.4.1.Получение первичных культур иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных	52
2.4.2.Методы исследования функциональной активности иммунокомпетентных клеток	54
2.6. Микроскопические методы	58
2.6.1. Электронная микроскопия	58
2.6.2. Атомно-силовая микроскопия	58
2.7. Методы статистической обработки результатов	59
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VITRO</i>	60
3.1. Определение физических параметров наночастиц серебра и углерод- ных нанотрубок	60
3.2. Изучение бактерицидной активности наночастиц серебра и углеродных нанотрубок в отношении <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, <i>Salmonella en- terica</i> 4412, <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ в экспериментах <i>in vitro</i>	64
3.2.1. Изучение бактерицидного действия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, в отношении <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>S. enterica</i> 4412, <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ <i>in vitro</i>	64
3.2.2. Изучение бактерицидного действия наночастиц серебра без покрытия в отношении <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>S. enterica</i> 4412, <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ <i>in vitro</i>	65

3.2.3. Изучение бактерицидного действия углеродных нанотрубок в отношении <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, <i>S. enterica</i> 4412, <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ <i>in vitro</i>	66
3.3. Заключение по Главе 3	66
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VITRO</i>	68
4.1. Изучение цитотоксических свойств наночастиц серебра и углеродных нанотрубок.....	68
4.2. Изучение влияния наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами перитонеального экссудата мышей.....	75
4.3. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию провоспалительных цитокинов спленоцитами мыши в условиях <i>in vitro</i>	78
4.4. Заключение по Главе 4.....	79
Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПУТИ ВВЕДЕНИЯ.....	81
5.1. Изучение воздействия наночастиц серебра на иммунную систему мышей после многократного введения ингаляционным, подкожным или внутрижелудочным способом.....	82
5.1.1. Гистологическое исследование органов мышей после многократного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном.....	82
5.1.2. Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхолегочного лаважа, после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном.....	84
5.1.3. Изучение цитотоксического воздействия наночастиц серебра на	

спленоциты мышей после введения их различными способами	85
5.1.4. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки.....	86
5.1.5. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию провоспалительных цитокинов у экспериментальных мышей	87
5.2. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на иммунную систему мышей после многократного введения ингаляционным, подкожным или внутривенным способом	89
5.2.1. Гистологическое исследование органов мышей после многократного воздействия углеродных нанотрубок	89
5.2.2. Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхолегочного лаважа	90
5.2.3. Изучение цитотоксического воздействия углеродных нанотрубок на спленоциты мышей после введения их различными способами	91
5.2.4. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей в зависимости от пути введения в организм	93
5.2.5. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на продукцию провоспалительных цитокинов у экспериментальных мышей	94
5.3. Заключение по Главе 5	94
Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОКРЫТЫХ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ, НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6.....	98
6.1. Воздействие наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на обсемененность легких и селезенки бактериями <i>M. tuberculosis</i> мышей линии C57Bl/6	98
6.2. Оценка иммунологических показателей хронически больных туберку-	

лезом мышей линии С57В1/6 после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном.....	100
6.2.1. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки мышей	100
6.2.2. Определение количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке мышей.....	101
6.2.3. Определение уровня цитокинов в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа мышей	103
6.2.4. Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей.....	108
6.2.5. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами мышей, больных туберкулезом	109
6.3. Заключение по Главе 6	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	118
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	120
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	122
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	147
БЛАГОДАРНОСТИ	149

ВВЕДЕНИЕ

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 туберкулезом в России в 2013 году составляла 89 случая на 100 тысяч человек, смертность - 12 случаев на 100 тысяч россиян [195]. При этом стабильно высоким остается количество пациентов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя туберкулеза: 37,5% среди больных ТБ органов дыхания [15].

Для лечения туберкулеза применяют пять основных противотуберкулезных препаратов: изониазид, рифампицин, пипразинамид, этамбутол или стрептомицин [13]. Основными недостатками данной терапии являются: резистентность *M. 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 [13, 14]. 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 туберкулезом 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 [28]. Перспективными с этой точки зрения являются наночастицы серебра (НЧС) и углеродные нанотрубки (УНТ). Наночастицы серебра характеризуются бактерицидностью против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [161, 197], включая антибиотикорезистентные штаммы [150]. Кроме того, наночастицы серебра увеличивают антибактериальную активность различных антибиотиков [166]. Углеродные нанотрубки широко применяются для адресной доставки лекарств в пораженные органы [121]. Имеются данные о бактерицидной активности углеродных нанотрубок [29, 55, 184, 201]. 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 [123, 138, 197]. Однако на данный момент в литературе практически отсутствуют систематизированные данные о воздействии наночастиц на иммунную систему. Также на сегодняшний день 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* [147, 164, 174]. 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 возникно-

вением иммунодефицитного состояния организма. В связи с вышесказанным, актуальным является комплексное изучение антимикобактериального действия наночастиц и иммунного статуса больных туберкулезом животных.

Цели и задачи

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

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

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

Показано, 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 оказывает воздействие на субпопуляционный состав лимфоцитов, количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и 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 хронически больных 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 коммерческого препарата «Арговит»: показана его бактерицидная активность против *M. tuberculosis* и иммуномодулирующее действие на лимфоцитарное и фагоцитарное звенья иммунитета мышей. По материа-

лам 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)».

Методология и методы исследования

На первом этапе диссертационного исследования была проведена оценка 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 было проведено исследование воздействия наночастиц на иммунную систему мышей *in vivo* в зависимости от пути введения; на четвертом этапе изучили антибактериальное действие наночастиц серебра на модели хронически больных туберкулезом мышей и провели оценку иммунного статуса данных лабораторных животных. В диссертационной работе использованы микробиологические, биологические, биохимические, иммунологические, микроскопические, гистологические экспериментальные методы исследования, а также методы статистической обработки результатов. Для проведения экспериментов, представленных в диссертационной работе, было использовано следующее оборудование: планшетный многофункциональный анализатор Victor X3 2030, Perkin Elmer, Финляндия (программное обеспечение WorkOut 2,5); проточный цитофлюориметр FACSCalibur, Becton Dickinson, США (программное обеспечение CellQuest Pro); электронный микроскоп «Hitachi» H-500, Япония (программное обеспечение Image Scope M); сканирующий зондовый микроскоп «Smart SPM», АИСТ-НТ, Россия (программное обеспечение Gwiddion, Czech Metrology Institute, Чехия); микротом «Reichert-Jung» (Германия); микроскоп Nikon Eclipse 80i (Япония); аэрозольная установка CO 099C A4224 (GLASCOL APPARATUS, США); автоматический клеточный счетчик CountessTM («Invitrogen»), Корея).

Положения, выносимые на защиту

1. Бактерицидное и цитотоксическое действия углеродных нанотрубок и наночастиц серебра прямопропорциональны 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 С57В1/6, 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 С57В1/6, 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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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 Международной 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 10 публикациях, в том числе в двух 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, работа с 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. Потаповым 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 аэробιοлогическιх 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. Герасимов В.Н.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Туберкулез

Туберкулез (ТБ) признан одной из главных причин заболеваемости и смертности во всем мире. Возбудителем данной инфекции является *Mycobacterium tuberculosis*. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в 2013 году во всем мире было установлено 9,0 миллионов новых случаев заболевания туберкулезом и 1,5 миллиона случаев смерти от ТБ (из них 1,1 миллиона человек ВИЧ – отрицательные и 0,4 миллиона – ВИЧ-положительные люди). Треть мировой популяции людей инфицирована *M. tuberculosis*, и около одного миллиарда человек добавиться к этому числу к 2020 году [195].

В России годовой риск заражения туберкулезом высок и составляет 0,5-1,5 %. Каждый день туберкулез уносит жизни 60 россиян. Наша страна занимает 13 место в мире по уровню заболеваемости туберкулезом. Российская Федерация (РФ) входит в число 22 стран, где регистрируется более 80 % случаев заболевания туберкулезом в мире. На долю РФ вместе с Бразилией, Индией, Китаем и Южной Африкой приходится 60 % расчетного числа случаев туберкулеза, вызванного возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Самая высокая процентная доля МЛУ-ТБ среди больных сконцентрирована в странах Восточной Европы и Средней Азии (это в основном бывшие республики СССР). Возможность ликвидации туберкулеза даже в отдельно взятой стране, декларированная ВОЗ, в XX веке не оправдалась, несмотря на то, что в 1960-1980 г.г. были достигнуты значительные благоприятные сдвиги в эпидемиологии туберкулеза [15, 195].

Туберкулез легких развивается вследствие заражения *Mycobacterium tuberculosis*. В соответствии с современной классификацией микроорганизмов *Mycobacterium tuberculosis* относится к царству *Bacteria*, типу *Actinobacteria*,

классу *Actinobacteridae*, подклассу *Actinomycetales*, отряду *Firmicutes*, подотряду *Corynebacterineae*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium* [5].

Бактерии *M. tuberculosis* – тонкие, прямые, слегка изогнутые палочки размером (1-10)×(0,2-0,6) мкм, со слегка закругленными концами, в цитоплазме содержат зернистые образования. *M. tuberculosis* относят к аэробам, но также они способны расти и в факультативно анаэробных условиях. Температурный оптимум их роста составляет 37-38 °С, оптимум рН 7,0-7,2. Микобактерии неподвижны, спор и капсул не образуют, но имеют микрокапсулу, отделенную от клеточной стенки осмиефобной зоной. Микобактерии окрашиваются по Грамму положительно, а также окрашиваются по Цилю-Нильсену при нагревании карболовым фуксином, который не обесцвечивается при воздействии кислот, щелочей и спирта. *M. tuberculosis* характеризуются кислотоустойчивостью и медленным ростом на питательных средах. При культивировании на плотных питательных средах микобактерии образуют мелкие нефотохромогенные R-колонии кремового цвета. В жидких питательных средах *M. tuberculosis* образуют пленку на поверхности и рыхлый осадок [6].

1.1.1. Иммунопатогенез туберкулеза

Основными входными воротами *M. tuberculosis* является респираторный тракт. Проникновение в организм микобактерий сопровождается формированием защитной реакции, которая приводит к блокированию распространения и размножения *M. tuberculosis* [19]. *Mycobacterium tuberculosis*, являясь внутриклеточными патогенами, обладают способностью резистентности и репликации внутри различных клеток млекопитающих, в том числе агрессивных фагоцитирующих клеток, представляющих первую линию защиты от вторжения патогенных микроорганизмов [165]. Попавшие в организм *M. tuberculosis* захватываются макрофагами и дендритными клетками, с последующим процессингом бактериальных антигенов и их представлением Т-лимфоцитам. Микобактерии туберкулеза инфицируют макрофаги и размножаются внутри, нарушая естественный механизм фа-

гоцитоза за счет выделения молекул, которые препятствуют слиянию фагосом с лизосомами [12]. Кроме того, из-за гидрофобной восковой клеточной стенки бактерии устойчивы к перевариванию лизосомальными ферментами и, следовательно, защищены от бактерицидного действия макрофагов [194]. Таким образом, с одной стороны, макрофаги фагоцитируют микобактерии с последующим представлением их антигенов Т-лимфоцитам. С другой стороны, макрофаги могут служить основным резервуаром патогена в тканях при незавершенном фагоцитозе [12].

При незавершенном фагоцитозе вместе с макрофагами *M. tuberculosis* переносятся в легочную паренхиму, а затем в регионарные лимфатические узлы, где происходит их размножение, а также формирование Т-клеточного иммунного ответа. Инфицированные макрофаги выделяют во внеклеточное пространство фрагменты разрушенных микобактерий, ряд протеолитических ферментов, цитокины, в том числе интерлейкин-1 (ИЛ-1), которые активируют Т-лимфоциты, в первую очередь Т-хелперы (CD3+CD4+) [12, 42]. Данная популяция лимфоцитов в зависимости от продуцируемых цитокинов подразделяется на два типа клеток: Т-хелперы первого типа (Th1) и Т-хелперы второго типа (Th2), активация которых определяет характер специфического иммунного ответа на различные патогенные субстанции. Активация Th1-клеток приводит к формированию клеточного иммунитета и характеризуется производством интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерферона-гамма (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), а активация Th2-клеток опосредует гуморальный иммунный ответ и характеризуется секрецией интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6 и ИЛ-10 [21, 188]. Развитие туберкулезной инфекции проходит по типу противоинфекционного иммунного ответа с преимущественной активацией Th1-клеток. Активированные Th1-клетки усиливают внутриклеточный клиренс фагоцитов за счет индукции слияния фагосом с лизосомами, что позволяет удалять патогены, персистирующие в фагосомах фагоцитов, а также участвуют в активации CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов, обеспечивающих защиту против внутриклеточных паразитов [19]. Продукция Th1-лимфоцитами ИЛ-2 и ИФН- γ

способствует миграции к месту локализации возбудителя и активации новых макрофагов. Активированные макрофаги дополнительно секретируют цитокины, в том числе фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), который инициирует формирование гранулемы, что ограничивает распространение микобактерий и препятствует их размножению. Однако полного уничтожения возбудителя туберкулезной инфекции не происходит. Организм остается инфицированным, и туберкулезная инфекция переходит в хроническую форму [12]. При хронизации заболевания может наблюдаться активация Т-хелперов второго типа (Th2), характеризующаяся синтезом антител и формированием иммунопатологических проявлений [21, 85].

В дальнейшем гранулема окружается плотной фиброзной капсулой, а ее центр некротизируется, чему способствует ФНО- α . Вследствие малоэффективного фагоцитоза микобактерий выделяется большое число токсичных веществ, нарушающих внутриклеточный метаболизм макрофагов и Т-лимфоцитов, снижая их жизнеспособность и функциональную активность [125, 162]. При активации такие клетки в значительном количестве подвергаются апоптозу, что приводит к формированию вторичного иммунодефицита. Кроме того, при туберкулезе апоптозу подвергаются и нейтрофилы. Гибель инфицированных клеток приводит к образованию экссудативного компонента воспаления с развитием казеозного некроза, последующим расплавлением тканей и прорыву некротических масс в просвет бронхов или сосудов. При прорыве казеозного содержимого в просвет бронха происходит диссеминация процесса в прилежащие участки легкого, а при прорыве в сосуд – генерализация и распространение процесса в отдаленные органы [12].

Формируется выраженный иммунодефицит, когда иммунокомпетентные клетки не в состоянии оказывать должного сопротивления инфекции и гибнут в большом количестве (апоптоз), что, в свою очередь, ведет к бурному и массивному размножению популяции микобактерий и прогрессированию туберкулезного процесса. Повышенный апоптоз ведет к уменьшению количества иммунокомпетентных клеток и сопровождается значительным снижением синтеза ИЛ-2 и ИНФ- γ [20]. При адекватной специфической химиотерапии снижается количество

M. tuberculosis, существенно снижается интенсивность апоптоза и, как следствие, увеличивается синтез ИЛ-2 и ИНФ- γ [11, 12].

1.1.2. Основные принципы лечения туберкулеза

На сегодняшний день существуют эффективные препараты против туберкулеза, но лечение ими подразумевает длительный период, что повышает риск развития побочных эффектов. В России для лечения туберкулеза в интенсивной фазе применяют пять основных противотуберкулезных препаратов: изониазид, рифампицин, пиперазид, этамбутол или стрептомицин [13]. Изониазид, рифампицин и пиперазид составляют ядро комбинации при воздействии на микобактерий туберкулеза [10]. Важно, что изониазид и рифампицин одинаково эффективно воздействуют на все группы микобактериальной популяции, находящиеся в очаге туберкулезного воспаления. Изониазид бактерицидно воздействует на микобактерии туберкулеза, чувствительные к обоим препаратам, и убивает устойчивых к рифампицину возбудителей. Рифампицин также убивает микобактерий туберкулеза, чувствительных к двум этим препаратам, при этом оказывает бактерицидный эффект на устойчивые к изониазиду микобактерии туберкулеза. Рифампицин эффективен в отношении персистирующих микобактерий туберкулеза, если они начинают «просыпаться» и усиливать свою метаболическую активность. Добавление к этим препаратам пиперазида, этамбутола и фторхинолонов усиливает воздействие на возбудителя и препятствует формированию вторичной лекарственной устойчивости [13, 191]. В случаях лекарственно устойчивого туберкулеза используют резервные противотуберкулезные препараты (канамицин, амикацин, капреомицин, циклосерин, этионамид, протионамид, фторхинолоны, парааминосалициловую кислоту, рифабутин), комбинирование которых и длительность приема до сих пор носят в основном эмпирический характер [13, 14]. В фазе продолжения лечения воздействуют на оставшуюся, медленно размножающуюся микобактериальную популяцию. Метаболическая активность микобактерий туберкулеза в такой популяции низкая, возбудитель находится в основном внутри-

клеточно в виде персистирующих форм. Большинство противотуберкулезных препаратов, применяемых в настоящее время в терапии, не проникают в макрофаги, в результате чего микобактерии остаются скрытыми от действия антибиотиков [160]. Это вызывает основные трудности в терапии туберкулеза. На этом этапе главными задачами являются предупреждение активного размножения оставшихся бактерий, а также стимуляция репаративных процессов в легких. Лечение необходимо проводить в течение длительного периода времени, чтобы обезвредить микобактериальную популяцию, которая в силу своей низкой метаболической активности плохо поддается уничтожению с помощью противотуберкулезных препаратов [13].

Необходимость многократного приема противотуберкулезных препаратов ежедневно или несколько раз в неделю приводит к несоблюдению пациентами режима терапии, что в свою очередь вызывает появление лекарственной устойчивости, а также отсутствие лечебного эффекта даже при наличии эффективных терапевтических средств [94].

Глобальный всплеск заболеваемости туберкулезом и быстрое распространение туберкулеза, вызванного микобактериями с множественной лекарственной устойчивостью, подчеркивают важность развития новых противотуберкулезных препаратов.

К сожалению, в течение 40 лет после выпуска рифампицина в США и других странах на рынке не появилось никаких новых противотуберкулезных препаратов, кроме рифабутина и рифапентинона. Признавая, что туберкулез по-прежнему является ведущей причиной смерти человека от излечимых болезней, международное медицинское сообщество поставило перед собой цель по ликвидации ТБ к 2050 году. Используя математическое моделирование, было показано, что к 2050 году цель не может быть достигнута с помощью современных средств и требует сочетания новых методов диагностики, более коротких схем лекарственного лечения ТБ и новых вакцин, которые смогут выявлять и лечить как латентную инфекцию, так и активное заболевание [57].

Поэтому поиск альтернативных способов лечения туберкулеза в настоящее время представляет собой актуальную задачу. Использование нанотехнологий является современным и перспективным направлением борьбы с туберкулезом. С помощью нанотехнологий становится возможным преодолевать сложности в терапии туберкулеза: доставлять антимикробное вещество непосредственно внутрь пораженных клеток, используя в качестве носителей наночастицы, и применять бактерицидный потенциал некоторых металлических наночастиц, к которым отсутствует резистентность у патогенов [28].

1.2. Использование наночастиц в медицине

В последнее время мир сталкивается с глобальной проблемой увеличения резистентности к антибиотикам, вызванного широким и часто неразборчивым использованием антибиотиков, пестицидов и родственных им соединений. В результате чего становится меньше эффективных препаратов, доступных для контроля инфекций, вызываемых хорошо известными бактериями. Бактериальная резистентность непрерывно растет, и контролирование этого процесса является основной задачей для ученых и врачей.

Кроме того в терапии инфекций, вызываемых внутриклеточными патогенами, существует проблема ограниченной внутриклеточной активности антимикробных препаратов по отношению к бактериям. Гидрофильность некоторых антибиотиков препятствует их проникновению в клетки и, кроме того, поглощенные молекулы антибиотика в основном накапливаются в лизосомах, где биологическая активность препарата сильно снижается [44, 163].

Наночастицы способны преодолеть существующие механизмы лекарственной устойчивости бактерий, такие как снижение поглощения и увеличение эффлюкса лекарства из микробной клетки, формирование биопленок, а также способны бороться с внутриклеточными возбудителями инфекций. Антибиотики, загруженные в наночастицы, можно вводить в клетки хозяина через эндоцитоз, а за-

тем, высвободить для удаления внутриклеточных микробов [26]. Использование наночастиц для пассивного поглощения инфицированными мононуклеарными фагоцитами повышает терапевтический индекс противомикробных препаратов во внутриклеточной среде при минимизации побочных эффектов, связанных с системным введением антибиотиков.

С помощью наночастиц становится возможным транспортировать антимикробные препараты в более высокой концентрации непосредственно в очаг инфекции, при этом сохраняя невысокую общую вводимую дозу для организма. Это позволяет преодолевать существующие механизмы антибиотикоустойчивости бактерий и снижать количество побочных эффектов препарата [111]. Также направленная доставка антимикробных средств к месту локализации внутриклеточных патогенов, используя наночастицы, является перспективным подходом в лечении таких инфекционных заболеваний как туберкулез.

В качестве потенциальных систем доставки лекарств были опробованы различные типы наночастиц: биоразлагаемые полимерные наночастицы, полимерные мицеллы, нанокапсулы, наногели, фуллерены, углеродные нанотрубки, твердые липидные наночастицы, нанолипосомы, дендримеры, металлические наночастицы и квантовые точки [165].

1.2.1. Углеродные нанотрубки

Углеродные нанотрубки представляют собой протяжённые цилиндрические структуры диаметром от одного до нескольких десятков нанометров, а длиной до нескольких сантиметров. Углеродные нанотрубки состоят из одной (однослойные) или нескольких (многослойные) свёрнутых в трубку графеновых плоскостей [108, 157]. Благодаря своим размерам нанотрубки могут легко поглощаться клетками. Форма позволяет УНТ проникать в клетку пассивной диффузией через липидный бислой или эндоцитозом, в результате чего УНТ прикрепляются к поверхности клетки, и затем поглощаются клеточной мембраной. Маркировка УНТ флуоресцентными агентами показала, что

углеродные нанотрубки легко проникают в клеточное ядро [130]. Полая монолитная структура УНТ и их способность связывать необходимые функциональные группы делают данные наночастицы перспективными носителями для доставки лекарственных веществ. Лекарства и биологические молекулы могут быть либо прикреплены к поверхности через функциональные группы, либо быть загружены внутрь нанотрубок [121]. УНТ могут быть функционализированы для того, чтобы приобрести большую водорастворимость и стабильность в сыворотке, а также низкую токсичность на клеточном уровне [155].

Углеродные нанотрубки характеризуются бактерицидной активностью в отношении широкого ряда микроорганизмов [29, 55, 184, 201]. В научной литературе выделяют следующие механизмы антимикробного действия УНТ: 1) нарушение целостности мембраны бактерий (сильным электростатическим взаимодействием между бактериями и УНТ; и / или окислением мембраны; или в результате механического повреждения мембраны); 2) индукция окислительного стресса, в результате чего образующиеся активные формы кислорода могут взаимодействовать непосредственно с органеллами бактерий или косвенно, вызывая повреждение ДНК или инактивацию белка, что ведет к гибели клеток 3) токсичность технологических примесей в УНТ 4) способствование бактериальной агломерации [86].

Бактерицидное действие УНТ зависит от их длины, заряда, функционализации, степени агрегации и наличия технологических примесей (аморфного углерода, металлических катализаторов). Так, более короткие однослойные УНТ проявляют меньший бактерицидный эффект, чем более длинные [201]. Нейтральные и отрицательнозаряженные УНТ более токсичны для бактерий по сравнению с положительнозаряженными [29]. Бактерицидный эффект индивидуально диспергированных УНТ более значительный, чем у агломерированных УНТ, что связано с повышением эффективности физического повреждения бактериальных мембран и нарушения целостности бактериальных клеток [117]. Результаты микроскопических исследований продемонстрировали, что клетки бактерий, инкубированные в

присутствии плохо очищенных углеродных нанотрубок, уменьшались в размере и имели уплощённые фрагменты, свободные от клеточного содержимого. Очищенные нанотрубки, контактируя с поверхностью клеток бактерий, не оказывали влияния на жизнеспособность бактериальной культуры [2]. Кроме того наблюдается зависимость бактерицидного эффекта от типа углеродных нанотрубок: у однослойных УНТ он более выражен по сравнению с многослойными УНТ. Это связано с менее плотным взаимодействием между бактериями и многослойными УНТ из-за более высокой жесткости, свойственной данным нанотрубкам, и более слабыми ван-дер-Ваальсовыми силами на их поверхности [29].

Однако воздействие однослойных и многослойных УНТ на организм млекопитающих одинаково вызывало гистопатологические изменения, в том числе формирование гранулем и фиброза, индукцию токсичных цитокинов и биомаркеров воспаления, окислительного стресса и цитотоксичность [131, 169].

Способность однослойных УНТ к биодegradации делает их перспективными для медицинского использования. Инкубация однослойных УНТ с пероксидазой хрена в течение 12 недель приводила к полной деградации углеродных наночастиц [25]. Аналогом пероксидазы хрена в организме человека является лейкоцитарная миелопероксидаза – фермент, обладающий способностью синтезировать гипохлорит, высокореакционный продукт, ответственный за антимикробное действие нейтрофилов в очагах воспаления и в фагосомах. Гипохлорит, окисляя углеродные нанотрубки, приводит к изменению их поверхности, увеличению размера пор и появлению новых функциональных групп, сопутствующих реакциям окисления (карбоксильных и гидроксильных групп) [199].

УНТ характеризуются высокой гидрофобностью и поэтому способны сорбировать на своей поверхности большое разнообразие органических веществ и макромолекул. Проникнув в кровь или в ткани, углеродные нанотрубки взаимодействуют в первую очередь с теми белками, концентрация которых максимальна – альбумин, иммуноглобулины, фибриноген. Концентрация миелопероксидазы в плазме крови даже в условиях воспаления не превышает

нескольких наномолей. Однако, опсонизированные УНТ, несущие на себе, в том числе иммуноглобулины, превращаются в мишень для нейтрофилов. Опсонизированные УНТ фагоцитируются нейтрофилами и попадают в фагосомы, где концентрация миелопероксидазы достигает 1-2 мМ, а NADPH-оксидаза-зависимая продукция перекиси водорода возрастает в сотни раз, что создает благоприятные условия для увеличения концентрации гипохлорита и общей концентрации окислительных белковых интермедиатов. Функционализация углеродных нанотрубок или изменения рН среды могут способствовать деградации однослойных УНТ. Проникнув в организм, около 95 % функционализированных УНТ выводятся с мочой в течение трех часов. Оставшаяся часть УНТ обнаруживается в печени и селезенке [107, 170]. Изменение физико-химических свойств однослойных углеродных нанотрубок в результате их биodeградации способствует снижению их цитотоксичности и вредных воздействий на организм [193].

Возможность за счет функционализации УНТ получать нетоксичный биodeградируемый материал открыл широкие перспективы возможного их применения. УНТ могут быть использованы в качестве носителей лекарственных препаратов, медленно выделяющихся в организме, для адресной доставки, для визуализации опухолей в диагностических исследованиях, в качестве бактерицидных препаратов пролонгированного действия. Использование УНТ при конструировании вакцин может позволить эффективно использовать антигены, которые ранее не были способны индуцировать соответствующий иммунный ответ, а также обеспечивать усиление и модуляцию иммунного ответа [139].

1.2.2. Наночастицы серебра

С древних времен серебро являлось одним из основных антимикробных средств в медицине и использовалось в терапии инфекционных заболеваний, особенно хирургических инфекций [24]. Терапевтические свойства серебра известны более 2000 лет. С девятнадцатого века соединения на основе серебра (нитрат серебра, сульфадиазин серебра, цеолит серебра, серебряный порошок, оксид серебра, хлорид серебра) стали широко использоваться в официальной медицине как антимикробные средства [148]. В настоящее время развитие нанотехнологий позволило манипулировать размером и свойствами веществ на наноуровне, результатом чего стало увеличение антимикробного потенциала серебра путем использования его в форме наночастиц. Данный эффект связан с изменениями физико-химических свойств материалов на наноуровне: увеличение коэффициента площади поверхности к объему наночастиц, в результате чего повышается их реактивность. Наночастицы серебра (размером не более 100 нм) получают из металлического серебра различными физическими, химическими и биологическими способами [150].

Наночастицы серебра демонстрируют высокую бактерицидную эффективность против бактерий, вирусов и грибов [167]. Бактерицидная активность наночастиц серебра во многом связана с их физико-химическими параметрами, такими как удельная поверхность (выраженная как отношение поверхности к объему), высокая адсорбционная способность, химическая активность и каталитические свойства [47, 60, 120]. Большая поверхность наночастиц серебра увеличивает возможность взаимодействия ионов серебра с бактериями, а наноразмер обеспечивает высвобождение ионов серебра в любой точке тела, что невозможно для более крупных частиц серебра [161].

Антибактериальные свойства наночастиц серебра зависят от их размера: чем меньше частицы, тем сильнее выражен бактерицидный эффект, поскольку более маленькие наночастицы имеют большую поверхностную площадь, которая

обеспечивает лучшее взаимодействие с бактерией. Наночастицы серебра, имея размер менее 100 нм, содержат 10000-15000 атомов серебра [150].

Наночастицы серебра, имеющие размер в диапазоне 10-100 нм, показали сильный бактерицидный потенциал в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [197]. В частности ряд исследований, проведенных на грамотрицательных бактериях рода *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* и *Vibrio* и грамположительных бактериях рода *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* показали высокий бактерицидный эффект наночастиц серебра. На основании экспериментальных данных было показано, что грамположительные бактерии более устойчивы к действию наносеребра по сравнению с грамотрицательными бактериями. Это объясняется тем, что клеточная стенка грамположительных бактерий содержит гораздо больше муреина и пептидогликана, что делает ее отрицательно заряженной. Из-за отрицательного заряда клеточной стенки грамположительных бактерий большое количество катионов серебра задерживается в стенке микроорганизмов, предотвращая проникновение наночастиц в клетку [46, 59].

Бактерицидная активность наночастиц серебра в отношении антибиотико-резистентных патогенов изучалась многими учеными, и было доказано, что наночастицы серебра являются мощным оружием против таких бактерий, как МЛУ *Pseudomonas aeruginosa*, ампициллин-резистентные *Escherichia coli*, эритромицин-резистентные *Streptococcus pyogenes*, метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA) и ванкомицин-резистентные *Staphylococcus aureus* (VRSA) [150].

Наночастицы серебра называют новым поколением противомикробных препаратов [151]. Уже сегодня наночастицы серебра применяют в медицине в качестве эффективных антимикробных агентов. Наночастицы серебра входят в состав поверхностных мазей и кремов для предотвращения инфекций в ожоговых и открытых ранах.

Несмотря на широкое применение наносеребра механизм антимикробного действия данных наночастиц находится на стадии изучения и является обсуждаемой темой [161].

Некоторые исследования показали, что наночастицы серебра атакуют грамотрицательные бактерии, прикрепляясь и проникая через клеточную стенку, что вызывает структурные изменения в клеточной мембране, в результате чего происходит увеличение клеточной проницаемости. Таким образом, возникает неконтролируемый транспорт через цитоплазматическую мембрану с последующей гибелью клеток [128, 173]. Было также показано, что антибактериальный механизм наночастиц серебра связан с образованием свободных радикалов, которые впоследствии индуцируют повреждения клеточной мембраны [97].

Morones с соавт. (2005) [128] предположили, что антимикробные свойства наночастиц серебра связаны со способностью ионов серебра взаимодействовать с тиоловыми группами жизненно важных ферментов и фосфорсодержащих основ, таких как ДНК. Это взаимодействие может нарушать деление клеток и репликацию ДНК, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [82].

Shrivastava с соавт. (2008) [168] выявили, что наночастицы серебра модулируют фосфотирозиновый профиль предполагаемых бактериальных пептидов, что может влиять на клеточную сигнализацию и приводить к ингибированию роста бактерий.

Hwang с соавт. (2008) [82] предположили синергетический токсический эффект наночастиц серебра и образующихся ионов серебра. Они отметили, что ионы серебра проникают в клетки и приводят к образованию химически активных радикалов кислорода. Именно непрерывное высвобождение катионов серебра из наноструктурированной поверхности оказывается определяющим фактором эффективной антибактериальной активности [46]. Кроме того, из-за повреждений мембраны, вызванных наночастицами серебра, бактериальные клетки не способны эффективно выталкивать ионы серебра и лимитировать их влияние [82].

В работе Klueh с соавт. (2000) [104] показали, что наночастицы серебра ингибируют рост бактерий путем инактивации белков. Атомы серебра связываются

с тиоловыми группами (-SH) ферментов, что деактивирует последние. Путем формирования стабильной связи с тиоловыми группами (S-Ag) серебро изменяет функцию соединений в клеточной мембране, что нарушает трансмембранное производство энергии и ионный транспорт. Серебро действует как катализатор в образовании дисульфидных связей, вызывая изменения в форме и структуре клеточных ферментов, что влияет на их функцию.

Бактерицидная активность наночастиц серебра объясняется тем, что ионы серебра, попадающие в клетку, располагаются между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями ДНК. При этом наблюдается нарушение водородных связей между двумя антипараллельными нитями, что ведет к денатурации молекулы ДНК [104].

Высокая активность наночастиц серебра обуславливается высвобождением кластеров Ag^0 и Ag^+ , в то время как при действии других источников серебра, таких как нитрат серебра и сульфадиазина серебра, высвобождается только Ag^+ [149].

На основании вышесказанного можно выделить следующие возможные механизмы антибактериального действия наночастиц серебра:

- Наносеребро атакует дыхательную цепь митохондрий бактерий, что ведет к гибели микроорганизмов [173].
- Наносеребро взаимодействует с серой, содержащейся в белках, на микробной клеточной оболочке, вызывая тем самым разрушение бактериальной клеточной стенки [113].
- Наносеребро ингибирует функции фосфорсодержащих соединений, подобных ДНК, на поверхности микробов [122].
- Наносеребро высвобождает в микробной клетке ионы Ag^+ , которые могут создавать свободные радикалы и индуцировать окислительный стресс, таким образом, повышая свою бактерицидную активность [97].
- Наносеребро обладает чрезвычайно большой площадью поверхности, что обеспечивает лучший контакт с бактериями [161].

– Наночастицы серебра способны прикрепляться к бактериальной клеточной мембране и легко проникать внутрь бактерий [151].

Антибактериальная эффективность наночастиц серебра обусловлена, в том числе их способностью предотвращать образование биопленок бактерий. Биопленки – самосекретирующаяся внеклеточная полисахаридная матрица, составленная из поверхностно-прикрепленных агрегатов микроорганизмов. Биопленки действуют как эффективный барьер против антимикробных агентов и иммунной системы хозяина, защищая бактериальные колонии. Было обнаружено, что наночастицы серебра препятствуют образованию биопленок [144]. При воздействии же наночастиц серебра на уже сформированные биопленки наблюдается снижение относительного количества крупных групп бактерий и подавление развития и функций биопленки [62].

В области медицины наиболее применяемыми являются антимикробные свойства наночастиц серебра, хотя противовоспалительные свойства наночастиц серебра также считаются чрезвычайно полезными в медицинской сфере. Научные исследования показали, что ускорение заживления ран в присутствии наночастиц серебра происходит из-за локального снижения активности металлопротеиназ и увеличения апоптоза нейтрофилов в ране. Было высказано предположение, что металлопротеиназа может вызывать воспаление и, следовательно, приводить к незаживающим ранам [102]. НЧС могут не только изменять экспрессию протеиназ, которые играют важную роль в воспалительных и репарационных процессах, но также супрессировать фактор некроза опухоли - α (ФНО- α), ИЛ -12 и ИЛ -1b и индуцировать апоптоз воспалительных клеток [39]. Также на мышинной модели было продемонстрировано снижение уровней провоспалительных цитокинов при ожоговой травме после введения наночастиц серебра [185].

Кроме того, наночастицы серебра увеличивают антибактериальную активность различных антибиотиков [166]. Было показано, что комбинированное использование наночастиц серебра с антибиотиками, такими как пенициллин G, амоксициллин, эритромицин и ванкомицин, приводит к усилению антибактери-

альных эффектов против грамположительных и грамотрицательных бактерий (например, *E. coli* и *S. aureus*), т.е. наблюдается синергический эффект [63, 151].

Благодаря продолжающимся исследованиям и развитию ожидается, что нанотехнологии будут иметь огромное влияние на медицину на десятилетия вперед [204]. Однако применение наночастиц в медицине подразумевает проведение предварительной тщательной оценки их безопасности и эффективности.

1.3. Токсичность наночастиц серебра

Увеличение всеобщего применения наночастиц в промышленности и общественном здравоохранении повышает вероятность их воздействия на организм человека [46]. Значение определения потенциальных рисков нанотехнологий для здоровья и жизни людей огромно. Поэтому наряду с выявлением и использованием положительных аспектов синтезированных наноматериалов необходимо оценивать их возможные отрицательные эффекты.

1.3.1. Свойства наночастиц серебра, определяющие токсичность

Для наноразмерных частиц размер, растворимость, покрытие, морфология, поверхностный заряд и площадь поверхности признаны важными детерминантами их токсичности [123].

- *Размер*

Многочисленные исследования показали, что чем меньше размер наночастиц серебра, тем сильнее проявляемые ими токсические эффекты [41, 43, 73, 118]. Размер-зависимая токсичность НЧС может быть объяснена увеличением удельной поверхности мелких частиц, приводящей к высокой реакционной способности или повышением высвобождения токсичных ионов серебра с поверхности частиц. Тем не менее, следует отметить, что исследования, упомянутые выше,

не демонстрируют четкой связи между наноразмерными явлениями, такими как квантовые эффекты или поверхностный плазмонный резонанс, и токсичностью.

- *Химия поверхности*

Для обеспечения стабильности наночастиц серебра в растворе часто используют поверхностное покрытие, препятствующее агрегации наночастиц [186]. В научной литературе существуют разрозненные результаты изучения влияния поверхностного покрытия на токсичность наночастиц. Так, Ahamed с соавт. (2008) [23] в своей работе показали, что наночастицы без покрытия агрегируют с образованием кластеров, которые затрудняют их проникновение в клетки и клеточные органеллы. Покрытые же полисахаридом гуммиарабиком наночастицы серебра проникают внутрь клеток и вызывают более тяжелые нарушения [23]. Nymark с соавт. (2013) [136] заключили, что покрытие наночастиц серебра ПВП снижает их токсичность, так как защищает эукариотические клетки от прямого токсического воздействия ионов серебра, в то время как наночастицы без полимерного покрытия проявляют большую токсичность к эукариотическим клеткам [136].

Кроме того, поверхностное покрытие способно создавать различные поверхностные заряды у одних и тех же наночастиц. Так, в работе Suresh с соавт. (2012) [181] было показано, что поверхностный заряд, создаваемый различными поверхностными покрытиями наночастиц серебра одного размера и формы, влияет на проявляемую ими токсичность. Положительно заряженные наночастицы серебра, покрытые поли(диаллилдиметиламмония) хлоридом, проявили наибольшую токсичность для мышинной макрофагальной линии RAW-264.7, по сравнению с отрицательно заряженными НЧС [181].

В отличие от результатов Suresh с коллегами, Yang с соавт. (2012) [202] обнаружили, что токсичность НЧС не зависит от заряда поверхности. Авторы пришли к выводу, что токсичность обусловлена главным образом растворением НЧС, которое обусловлено поверхностным покрытием [202].

Поверхностные покрытия и поверхностный заряд влияют на биодоступность наночастиц серебра и их взаимодействие с клеточными системами. Однако

сложность поверхностной химии НЧС заключается в том, что при контакте с биологической средой их поверхность немедленно покрывается белками. Формирование белковой короны на поверхности наночастиц придает новую «биологическую идентичность» частиц в биологической среде, которая определяет последующие клеточные и тканевые ответы. Поверхность наночастиц в биологических средах полностью отличается от исходной нетронутой поверхности наночастиц [126]. Формирование белковой короны представляет собой динамичный, конкурентный процесс, в результате которого образуются два слоя: «жесткая корона» (относительно неподвижный слой, состоящий из белков с более высоким сродством) и «мягкая корона» (слабосвязанный слой, строение которого менее изучено) [127]. Состав и толщина белковой короны зависят от формы наночастиц. Различное соотношение формы наночастиц/белок наночастиц создает трудности в экстраполяции результатов *in vitro* и *in vivo*. В случае сферических НЧС (16 нм) было обнаружено пять белков (серотрансферрин, сывороточный альбумин, альфа-фетопротеин, кининоген-1 и фибриноген α -цепи), связанных с жесткой короной после одного часа инкубации в присутствии фетальной бычьей сыворотки [33]. Однако вопрос о динамике короны наночастиц серебра в ответ на изменение концентрации белков, времени инкубации, размера наночастиц и их поверхности покрытия остается открытым.

- *Ионное высвобождение*

Существует научное мнение, что ионы серебра способствуют биологической активности наночастиц серебра. Понимание кинетики ионного высвобождения в оценке рисков для НЧС имеет решающее значение. Если токсичность НЧС обусловлена выпуском ионов серебра, современные знания о видообразовании растворенного серебра и его токсичности могут быть информативными в оценке риска. Если же НЧС имеют уникальную токсичность, вытекающую из их наноразмерной формы, необходимы дополнительные исследования. Многие ученые провели исследования, посвященные изучению влияния ионной силы и времени растворения на поведение наночастиц серебра [103, 114, 115, 116].

НЧС состоят из элементарного серебра (Ag^0), которое не растворимо и не активно в чистой воде, но растворимо в кислых растворах (например, азотной кислоты) [196]. Тем не менее, наночастицы серебра растворимы в водных растворах в окислительных условиях. Растворение наночастиц серебра в водных растворах включает в себя два связанных процесса: 1) окисление с выделением активных форм кислорода; 2) протонно-опосредованное высвобождение растворенного серебра. Согласно этому, ионное высвобождение можно контролировать различными способами: использованием лигандов и полимерных покрытий, изменением путей окисления и площади поверхности, очищением пероксидных продуктов и предварительной обработкой окислением [115]. Поверхностное окисление НЧС приводит к образованию высокореакционного ионного серебра, которое как адсорбируется на поверхности наночастиц, так и высвобождается в окружающую среду. Поэтому коллоидные суспензии из НЧС содержат, по меньшей мере, три формы серебра: наночастицы серебра, растворенное серебро (как ионное серебро, так и растворимые серебряные комплексы), и ионное серебро, адсорбированное на поверхности НЧС [116].

На скорость высвобождения ионов серебра влияет размер наночастиц. Чем меньше наночастицы, тем выше скорость ионного высвобождения. Однако чем меньше размер наночастиц, тем больше площадь их поверхности. Следовательно, площадь поверхности управляет скоростью высвобождения ионов серебра. Кроме того, площадь поверхности наночастиц влияет на скорость их растворения. Мелкие наночастицы растворяются быстрее, чем более крупные [115].

Концентрация частиц также влияет на растворение на наноуровне. Скорость растворения выше для более низких концентраций наночастиц серебра. При более высоких концентрациях ключевые факторы, влияющие на растворение, такие как доступ кислорода и присутствие протонов (pH), могут быть истощены, и высокие концентрации растворенного серебра и лигандов, ингибирующие поверхностные реакции, тормозят растворение [116]. Окислительное растворение является сложной химической реакцией зависящей от pH, покрытия, температуры и присутствия лигандов в окружающей жидкости [114]. Так, в работе Kittler с соавт. (2010) [103]

была показана зависимость скорости растворения от типа поверхностного покрытия наночастиц серебра и температуры. Скорость растворения и конечная степень растворения была выше для ПВП-покрытых наночастиц серебра по сравнению с цитрат-покрытыми. Увеличение температуры приводило к увеличению растворения [103]. Другие исследования показали, что присутствие цистеина или бычьего сывороточного альбумина (БСА) усиливает растворение НЧС [71, 114].

Для имитации биорастворения наночастиц серебра были проведены эксперименты в нескольких искусственных биологических жидкостях, представляющих желудок, лизосомы, раны и кровь. Искусственная межклеточная жидкость (раствор Гэмбл, рН 7,4) и искусственная лизосомальная жидкость (ALF, рН 4,5) были использованы для имитации растворения в жидкости верхних дыхательных путей или в фаголизосомах макрофагов, соответственно. В этих моделируемых биологических жидкостях не было обнаружено растворения НЧС до ионов серебра. Однако, жидкости, используемые в данной работе, содержат значительное количество хлорида натрия, и, таким образом, растворение может сопровождаться последующим осаждением серебряно-хлоридных комплексов (контроль присутствия ионов серебра не проводился) [177]. Кроме того, измерение ионов серебра включает этап фильтрации, а некоторые фильтры связывают большое количество серебра [93].

Другое исследование показало, что НЧС (5 нм) растворялись в синтетическом желудочном соке (рН 1,12) относительно быстро, в то время как в раневой жидкости (рН 7,52) это происходило очень медленно. Но добавление БСА значительно увеличивало скорость растворения [114]. Rogers с соавт. (2012) [153] провели исследования растворимости цитрат-стабилизированных НЧС (1-10 нм и 40 нм) в синтетической желудочной жидкости (рН 1,5) и обнаружили, что наночастицы образуют агломераты, которые высвобождают ионы серебра, и частично реагируют с образованием серебряно-хлоридных комплексов [153].

Таким образом, в настоящее время большое количество исследований посвящается изучению химических превращений наночастиц серебра в биологиче-

ских средах, однако точные механизмы видообразования серебра внутри клеток по-прежнему не установлены.

Результаты исследований токсикологической роли растворения наночастиц серебра неоднозначны. Некоторые исследователи предполагают, что цитотоксичность НЧС не зависит от концентрации ионов серебра и обусловлена главным образом окислительным стрессом [98]. Тем не менее, другие исследования показывают, что механизм токсичности НЧС во многом объясняется наличием ионов серебра [38, 40, 133, 202].

Наночастицы серебра способны преодолевать биологические барьеры, а затем, выпускать ионы серебра, повреждающие клеточную структуру [140]. То, что НЧС способны выступать в качестве эффективного средства доставки ионов серебра, было также показано в работе Navarro с соавт. (2008) [133].

Недавнее исследование, посвященное изучению механизма токсичности наночастиц серебра различных размеров и с различными покрытиями относительно *C. Elegans*, показало линейную корреляцию между токсичностью НЧС и их растворением. Однако все тестируемые в данном исследовании наночастицы продемонстрировали меньшую токсичность, чем при полном растворении той же массы серебра в виде ионов серебра [202].

Несмотря на многочисленность работ, показывающих, что цитотоксичность НЧС в значительной степени объясняется наличием ионов серебра, все еще остается неопределенным по какому механизму (-ам) и в какой степени ионы серебра играют роль в НЧС-опосредованной токсичности. Кроме того, существуют исследования, показывающие, что наночастицы серебра могут влиять на клетки и более сложным способом [65].

1.3.2. Токсикодинамика наночастиц серебра

Для оценки механизмов токсичности наночастиц серебра в многочисленных исследованиях изучают специфические клеточные процессы, используя тест-системы *in vitro*, которые являются высоко воспроизводимыми. Существующие исследования в первую очередь сосредоточены на клеточных линиях млекопитающих. Однако, поскольку типы клеток, условия культивирования и виды НЧС различаются, результаты этих исследований не являются прямо сопоставимыми. Современное знание механизмов НЧС-индуцированной токсичности, включает окислительный стресс, клеточную смерть и генотоксичность.

- *Окислительный стресс*

Окислительный стресс, который вызывается дисбалансом между продукцией активных свободных радикалов в организме и его антиоксидантной способностью, был описан в качестве важного механизма в нанотоксикологии [134, 138].

Основным фактором, определяющим окислительный стресс, является генерация активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота. Активные формы кислорода включают в себя исходные свободные радикалы, образующиеся при восстановлении кислорода (супероксид или перекись водорода), а также их вторичные реактивные продукты. Активные формы азота представляют собой активные радикалы, полученные из окиси азота [198]. Активные радикалы генерируются нейтрофилами и макрофагами в организме при воспалении. Эукариотические организмы обладают широким спектром белков для детоксикации АФК и восстановления поврежденных при окислении ДНК, липидов и белков. Эти антиоксиданты включают ферментативные акцепторы, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза и пероксиредоксины, а также неферментативные факторы, такие как глутатион и витамины [68].

Воздействие наночастиц серебра на эукариотические клетки в экспериментах *in vitro* приводило к реакциям, связанным с окислительным стрессом [35, 36,

76, 124, 172]. Маркером окислительного стресса является генерация АФК. Производство АФК вызывает окислительное повреждение клеточных компонентов и в конечном итоге приводит к гибели клеток. Окислительный стресс является одним из ключевых механизмов токсичности наночастиц серебра и может способствовать апоптозу в ответ на различные сигналы и патофизиологические условия [66, 72, 87].

Генерация активных промежуточных форм кислорода происходит при окислительном распаде НЧС, указывая на механизм прямого воздействия, опосредованного наночастицами [116]. Предварительная обработка клеток цианидом, ингибитором митохондриальной активности, приводит к ингибированию продукции АФК, индуцированной наночастицами серебра [79]. Это указывает на то, что в НЧС-опосредованном производстве АФК участвуют митохондрии.

В другом исследовании антиоксидантная способность человеческой сыворотки была снижена при воздействии наночастиц серебра в экспериментах *in vivo*, показывая, что НЧС вызывают истощение антиоксидантов [152]. Глутатион является основным эндогенным антиоксидантным акцептором, который защищает клетки от окислительного стресса благодаря своей способности связываться с АФК и восстанавливать их. Некоторые исследования сообщают об увеличении уровня глутатиона при воздействии НЧС [30, 89], что может являться клеточной защитой от НЧС-опосредованного окислительного повреждения. Напротив, другие исследования показали снижение уровня глутатиона, что коррелировало с АФК маркерами [43], означая либо ингибирование глутатион-синтезирующих ферментов, либо истощение глутатиона.

Ионы серебра интенсивно связываются с глутатионом и другими молекулами, содержащими тиоловые группы [114], и могут, таким образом, играть роль в истощении глутатиона. Другими маркерами окислительного стресса, обнаруженных в ответ на воздействие НЧС, являются стресссвязанный ген транскрипции [40, 65], белок карбонилирования [73, 145] и перекисное окисление липидов [145].

Следует отметить, что генетический фон человеческих клеточных линий очень разнообразен и при оценке реакции *in vitro* того или иного токсиканта это

может быть важным. В научных работах, посвященных изучению токсичности наночастиц серебра, было обнаружено, что разные клеточные линии проявляют различную чувствительность к воздействию НЧС, в том числе к НЧС-индуцированному окислительному стрессу [36, 66, 67].

Таким образом, анализ научной литературы позволяет сделать вывод, что НЧС-индуцированный окислительный стресс может быть обусловлен истощением антиоксидантов, окислительным растворением НЧС или нарушениями в митохондриях. Разрозненность результатов между исследованиями объясняется тем, что наночастицы серебра способны индуцировать окислительный стресс разными путями [202].

• *Клеточная смерть*

Гибель клеток часто связана либо с некрозом, либо с апоптозом, где первый характеризуется как случайный и патологический, а второй считается контролируемым, запрограммированным и физиологическим механизмом. Термин «запрограммированный» в данном контексте означает, что разрушение клетки регулируется с помощью специфических генов и включает в себя активацию специфических молекулярных путей. Ранее считали, что запрограммированная гибель клеток происходит либо по внешнему, рецептор-опосредованному пути, либо по внутреннему, митохондрия-опосредованному пути. Также были определены другие механизмы, такие как аутофагическая гибель клеток и некроптозис (регулируемый некроз). На сегодняшний день выделяют 13 различных типов регулируемой гибели клеток, тем самым, подчеркивая сложность процесса клеточной гибели [69]. Различные наноматериалы могут активировать несколько путей запрограммированной гибели клеток. На сегодня считается, что основным механизмом запрограммированной гибели клеток, вызванной наночастицами серебра, является митохондрией-зависимый (внутренний) апоптоз. Внутренний апоптоз активируется в ответ на многочисленные типы клеточного стресса, в том числе повреждение ДНК, окислительный стресс, перегрузки цитозольного кальция, повреждение эндоплазматического ретикулаума [27]. Окислительный стресс считается ключевым

фактором НЧС-опосредованного апоптоза. Однако, механизм, по которому наночастицы серебра вызывают апоптоз, до конца не определен. Например, недавнее исследование показало, что НЧС могут оказывать цитотоксические эффекты через модуляцию путей стресса эндоплазматического ретикулума [205].

• *Генотоксичность*

В ряде научных работ было показано, что наночастицы серебра вызывают генотоксические эффекты в клетках человека и млекопитающих [23, 32, 64, 66, 74, 92, 112, 136]. Генотоксическое действие НЧС проявлялось в разрывах ДНК, нарушении микроядерных процессов и хромосомных aberrациях. Основной причиной генотоксических эффектов наночастиц серебра является их способность генерировать АФК, вызывающие повреждение белков или ДНК [95]. Однако существуют научные работы, в которых не было обнаружено генотоксических эффектов наночастиц серебра [31, 143].

1.3.3. Токсикокинетика наночастиц серебра

Наночастицы серебра могут поглощаться организмом человека при вдыхании, проглатывании, попадании на кожу. Поглощение представляет собой процесс, при котором неизменные соединения перемещаются из места введения в центральное кровообращение. После проникновения в кровоток, токсикант распределяется в тканях всего организма.

Ингаляция

Дыхательная система представляет собой крупные ворота входа. Ингаляционное воздействие наночастиц серебра на человека может происходить в производственных условиях при изготовлении наносеребрянных продуктов. Кроме того на сегодняшний день широкому потребителю доступны спреи, содержащие наносеребро [189]. Изучение ингаляционного воздействия наночастиц серебра на

животных показало, что при вдыхании серебро абсорбируется в системном кровотоке и затем распространяется в органы [83, 88, 96, 175, 176, 178, 179, 180, 182].

Желудочно-кишечное поглощение

На сегодняшний день разработаны НЧС-содержащие материалы, предполагающие контакт с пищевыми продуктами. Водные дисперсии коллоидного серебра все чаще продаются как пищевые добавки [45]. Таким образом, проглатывание НЧС является актуальным путем воздействия. После перорального введения наночастиц или ионов серебра крысам серебро абсорбируется в системном кровотоке. Основной биодоступной формой серебра при пероральном приеме является ионное серебро [75, 100, 119, 190].

Кожная абсорбция

В настоящее время широко используются антибактериальные текстиль и лосьоны, содержащие наночастицы серебра. В рамках системы здравоохранения для лечения ожогов и других типов повреждения кожи используются перевязочные материалы, содержащие НЧС [192, 197]. В работах, посвященных изучению кожной абсорбции наносеребра, было показано, что наночастицы серебра способны проникать в верхние слои эпидермиса [110] и поверхностные слои рогового слоя кожи [159]. В сыворотках крови пациентов, пострадавших от ожогов, для лечения которых использовали НЧС-содержащие раневые повязки, наблюдались повышенные уровни содержания серебра, что свидетельствует о кожной абсорбции наносеребра в кровотоки [192].

Распределение в органах и тканях

Распределение наночастиц серебра зависит от дозы, размера частиц и времени экспозиции, а также может зависеть от белкового связывания. Различия в характере распределения наночастиц определяет различия в проявляемой токсичности. Печень и почки были описаны как первичные органы для осаждения нано-

частиц серебра при пероральном [100, 101, 119] внутривенном [109, 142], подкожном [183] и ингаляционном воздействиях [179, 182].

Селезенка также является одним из основных органов-мишеней у мышей и крыс, подвергнутых воздействию НЧС внутривенно [49, 109], внутрибрюшинно [70] и через желудочный зонд [190]. Некоторые исследователи сообщают, что НЧС распределяются в семенниках и в мозге [100, 101, 190]. Выведение серебра из мозга и семенников происходит очень медленно, так, через два месяца после воздействия наночастиц серебра в этих органах сохранялись высокие концентрации серебра [190]. Важно отметить, что характер биораспределения при пероральном введении был одинаков и для ионов серебра, и для НЧС [119,190].

Метаболизм (Биотрансформация)

Биотрансформация описывает процессы, где физико-химические свойства поглощенного чужеродного соединения ферментативно изменяются с целью выведения из организма. Тем не менее, нет никаких доказательств того, что метаболизм наночастиц серебра происходит с помощью ферментов в печени или в других частях тела. Существует предположение, что НЧС или выделяемые ионы серебра способны взаимодействовать с металлотioniнами [197]. Металлотioniны являются белками, которые присутствуют во всех живых клетках, и имеют уникальную структуру, благодаря которой способны связывать металлы, такие как цинк и серебро. Они регулируют клеточный гомеостаз металлов и играют цитопротективную роль [51]. Другой механизм детоксикации серебра осуществляется за счет депонирования его в тканях в качестве нетоксичных серебро-белок комплексов или сульфида серебра [34, 56]. Конечным продуктом ионов серебра, введенных интраназально, являются сульфид серебра или молекулы селенида серебра, которые накапливаются внутриклеточно в лизосомах в виде нанокристаллов [106]. После перорального введения наночастиц серебра также были обнаружены гранулы серебра, содержащие селен и серу, в лизосомах различных тканей [119].

Элиминация (Выведение)

После перорального или ингаляционного воздействия соединений серебра, большее количество серебра выводится из организма через фекалии и в некоторой степени с мочой [34, 56]. После внутривенного введения наночастиц серебра крысам серебро было обнаружено в кале через 24 часа после обработки, что свидетельствует о билиарной экскреции [142]. При пероральном воздействии наночастиц серебра на крыс концентрация серебра в моче была также очень низкой по сравнению с уровнями в кале [119]. Другое исследование на крысах показало сопоставимые уровни серебра в моче и кале после внутривенного введения НЧС [58]. Важно отметить, что уровень серебра в моче и кале достигал максимума на первые и вторые сутки после воздействия, соответственно, и был значительно выше для мелких НЧС (20 нм), чем для более крупных наночастиц серебра (200 нм), что указывает на более высокий проникающий характер наночастиц небольшого размера [58]. В медицинской практике описаны повышенные уровни ионов серебра в моче пациента после кожного контакта с серебряным покрытием раневой повязки «Acticoat» [187].

1.3.4. Иммунотоксичность наночастиц серебра

При проникновении в организм наночастицы первыми захватываются фагоцитирующими клетками иммунной системы. При контакте наночастиц с иммунной системой организма возникает вероятность их нежелательных взаимодействий. По данным некоторых авторов показано, что, взаимодействуя с клетками иммунной системы, наночастицы могут вызывать воспалительные или аутоиммунные реакции, увеличивать чувствительность хозяина к инфекции или раку, влиять на количество и функциональную активность популяций иммунных клеток, вызывая, например, супрессию активности натуральных киллеров и стимуляцию лимфоцитов селезенки [52, 206]. В работах других исследователей наночастицы серебра не оказывают иммунотоксического эффекта [190].

Иммунная система делится на две различные, но взаимосвязанные системы: врожденный и адаптивный иммунитет. Врожденный иммунитет характеризуется ранней реакцией на чужеродные агенты с очень прочными путями, способными быстро установить ответ против широкого разнообразия антигенов. Однако если такие реакции не полностью эффективны и начинается хроническое воздействие чужеродных агентов, адаптивный иммунитет приспосабливается к этим специфическим антигенам для более полноценного защитного действия. Врожденный иммунитет является первоосновой иммунного ответа, также как опсонизация антигенами является ключевым моментом для клиренса ретикуло-эндотелиальной системы.

Попадая в организм, наночастицы опсонизируются белками. Наиболее распространенными являются иммуноглобулины и компоненты системы комплемента, а также белки сыворотки крови, такие как альбумин и фибриноген [53]. После чего нейтрофилы и макрофаги способны распознавать наночастицы как чужеродные и активироваться для их фагоцитирования. Сверхактивация может приводить к гибели фагоцитирующих клеток и высвобождению опасных продуктов, таких как АФК, оксида азота и лизосомальных ферментов. Также, активация фагоцитирующих клеток приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, стимулированию воспалительного ответа и рекрутизации еще большего количества нейтрофилов и макрофагов [156].

Активация комплемента – другой путь активации иммунной системы наночастицами. Такая активация может возникать как классическим, так и альтернативным путями, либо адсорбцией антител, либо адсорбцией C3b и других белков комплемента на поверхности наночастиц.

Степень, с которой возникают иммунные ответы в ответ на воздействие наночастиц, определяется их физико-химическими свойствами. На активацию комплемента влияют размер, форма, заряд и гидрофильность наночастиц. Отрицательно заряженные частицы могут активировать комплемент по классическому пути, а положительно заряженные – по альтернативному [48]. Кроме того наночастицы способны активировать комплемент по обоим путям [158].

На активацию комплемента также влияет поверхностная модификация наночастиц. Так в работе Vonarbourg с соавт. (2006) [156] было показано, что покрытие наночастиц полиэтиленгликолем значительно снижает активацию комплемента.

Поверхностная модификация наночастиц также влияет на цитокиновый ответ иммунных клеток. Наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном, снижали продукцию ИЛ-6 и ФНО- α мышинными макрофагами линии J774, зараженных *Chlamydia trachomatis* [203].

Однако в некоторых исследованиях сообщается об индукции продукции цитокинов различными типами наноматериалов (коллоидное серебро, дендримеры, полимеры, липидные наночастицы). Размер наночастиц представляется как ведущий параметр, который определяет способность наночастиц индуцировать цитокиновый ответ [206].

На цитокиновую активность также влияет заряд наночастиц. В работе Dobrovolskaia с соавт. (2007) [156] было показано, что отрицательно заряженные частицы не индуцировали продукцию цитокинов лейкоцитами, а положительно заряженные – индуцировали.

В научной литературе обсуждается возможная роль серебра как иммуномодулятора. В зависимости от дозы данный металл может, как стимулировать, так и угнетать фагоцитоз. Благодаря хорошо выраженным антимикробным и бактерицидным свойствам серебро рассматривают как необходимый микроэлемент для иммунной системы [1, 4].

Известно, что главная функция иммунной системы – это защита хозяина от чужеродных агентов, однако, ненамеренное распознавание наночастиц как чужеродных иммунными клетками может вызывать многоуровневые иммунные реакции против наночастиц и в итоге приводить к токсическим эффектам в организме и/или отсутствию терапевтической эффективности нанолекарств [206].

1.4. Заключение по обзору литературы

Анализ научной литературы показал, что туберкулез до сих пор остается медико-социальной угрозой. Большинство противотуберкулезных препаратов, применяемых в настоящее время в терапии, не проникают в макрофаги, в результате чего микобактерии остаются скрытыми от действия антибиотиков. Кроме того, необходимость многократного приема противотуберкулезных препаратов в высоких дозах приводит к несоблюдению пациентами режима терапии, что вызывает отсутствие лечебного эффекта даже при наличии эффективных терапевтических средств. Это вызывает основные трудности в терапии туберкулеза. На сегодняшний день ведутся активные поиски новых эффективных противотуберкулезных препаратов. 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. Перспективными в этом плане являются наночастицы серебра и углеродные нанотрубки, благодаря тому, что обладают высоким бактерицидным потенциалом и за счет функционализации могут обладать низкой токсичностью в отношении эукариотических клеток.

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. Однако на сегодняшний день редко проводятся комплексные исследования воздействия наночастиц на внутриклеточные бактерии. Так, работы, посвященные изучению антимикобактериальной эффективности наночастиц серебра, в научной литературе немногочисленны, и в основном показывают ингибирующую рост *M. tuberculosis* активность данных наночастиц в экспериментах *in vitro* [147, 164, 174]. Исследования антимикобактериального действия НЧС на животных моделях хронического ТБ с одновременной оценкой изменения иммунных

показателей отсутствуют. Известно, что развитие туберкулеза сопровождается возникновением иммунодефицитного состояния организма. Поэтому очевидно, что необходимо комплексное изучение антимикобактериального действия наночастиц серебра и иммунного статуса больных туберкулезом животных. Для использования наночастиц в медицине необходим анализ факторов, снижающих их токсичность для макроорганизма (поверхностное покрытие, наиболее безопасный способ введения, доза и многократность приема) и обеспечивающих эффективную антибактериальную активность. Поэтому одновременная оценка антимикобактериальной эффективности и токсичности наночастиц необходима для возможности их использования в профилактических и лечебных противотуберкулезных мероприятиях.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Микробиологические методы

2.1.1. Штаммы микроорганизмов

В работе использованы штаммы, полученные из коллекции микроорганизмов «ГКПМ – Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ:

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ГКПМ – Оболенск Б 4825);
- *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ (ГКПМ – Оболенск Б 4341);
- *Salmonella enterica* 4412.

2.1.2. Среда и условия культивирования микроорганизмов

Бактериальную суспензию штамма *M. tuberculosis* H37Rv в концентрации 1×10^7 клеток/мл, выращенную в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 (HiMedia, Индия), доводили методом серийных десятикратных разведений в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 0,05 % Твина 80 до концентрации 1×10^3 клеток/мл. Культивирование проводили при температуре 37 °С на плотной питательной среде Middlebrook 7H11 AgarBase (HiMedia, Индия).

Микробную взвесь штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ готовили путем суспендирования изолированных колоний из 48-часовой культуры с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП). Методом серийных 10-кратных разведений в ЗФР концентрацию клеток штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ доводили до 5×10^2 клеток/мл. Культивирование проводили при температуре 37 °С на плотной питательной среде FT- агар (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Микробную взвесь штамма *S. enterica* 4412 готовили путем суспендирования изолированных колоний из 24-часовой культуры с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-09П). Методом серийных 10-кратных разведений в ЗФР

концентрацию клеток штамма *S. enterica* 4412 доводили до 10^2 клеток/мл. Культивирование проводили при температуре 37 °С на плотной питательной среде ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ).

2.1.3. Определение бактерицидной эффективности наночастиц *in vitro*

Определение бактерицидной эффективности наночастиц *in vitro* в концентрациях 50; 25; 10; 1; 0,25 и 0,1 мг/л проводили на штаммах *Salmonella enterica* 4412, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv («ГКПМ – Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ).

К бактериальной культуре *S. enterica* 4412 добавляли наночастицы в тестовых концентрациях и выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем производили высев на плотную питательную среду ГРМ-агар по 0,1 мл. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч, после чего проводили подсчет колоний.

К бактериальной культуре *F. tularensis* 15 НИИЭГ добавляли наночастицы в тестовых концентрациях и выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем производили высев на плотную питательную среду FT-агар по 0,2 мл. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч, после чего проводили подсчет выросших колоний.

К бактериальной культуре *M. tuberculosis* H37Rv добавляли наночастицы в тестовых концентрациях и выдерживали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем производили высев на плотную питательную среду 7H11 по 0,1 мл. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 28 сут, после чего проводили подсчет выросших колоний.

2.1.4. Определение обсемененности органов животных *M. tuberculosis*

Определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. tuberculosis* H37Rv в органах зараженных животных проводили высевом гомогенатов органов методом десятикратных разведений в забуференном физиологическом растворе с добавлением 0,05 % Твин-80 на плотную питательную среду Middelbrook 7H11 (HiMedia, Индия), содержащую 20 % сыворотки крупного рогатого скота (КРС). Чашки с культурой инкубировали в запечатанных пластиковых пакетах при температуре 37 °С, предварительный учет выросших колоний проводили через 21 сут, окончательный – через 28 сут.

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

Ингаляционное введение препарата проводили однократно в дозе 0,1 мг наночастиц серебра на 1кг массы тела с использованием аэрозольной камеры СО 099С А4224 (GLAS-COL APPARATUS, США). Микробиологические высевы из легких и селезенок проводили на 1, 10 и 30 сут после обработки наночастицами серебра.

2.2. Биотехнологические методы

2.2.1. Наночастицы серебра:

– **НЧС-ПВП** – водная дисперсия наночастиц серебра, стабилизированных низкомолекулярным полимером медицинского назначения поливинилпирролидоном (ПВП) (препарат «Арговит», ООО НПЦ «Вектор-Вита», Россия). В данном препарате содержится 1,0-1,4 % серебра (по массе) и 18,6-19,0 % ПВП с молекулярной массой 15-30 кДа.

– **НЧС** – коллоидный раствор наночастиц серебра в воде (Plasma Chem, Berlin, Germany).

2.2.2. Углеродные нанотрубки

В работе использованы однослойные углеродные нанотрубки (Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева, РАН, Новгород, Россия). Для экспериментальной работы сухой порошок углеродных нанотрубок суспендировали в стерильной дистиллированной воде до концентрации 3,7 мг/мл. Полученную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора Virtis (США) в режиме охлаждения. Затем отбирали по 1 мл суспензии УНТ и центрифугировали две минуты при скорости вращения 6000 об/мин. Полученный супернатант (0,8 мг/л) использовали как маточный раствор для дальнейшей работы. Из него получали рабочие растворы для обработки мышей и клеток.

2.3. Биологические методы

2.3.1. Лабораторные животные

В работе использованы мыши линии BALB/c и C57Bl/6 в возрасте 6-8 недель, весом 18-20 г. Животные были получены из филиала «Андреевка» Федерального Государственного бюджетного учреждения «Научный центр биомедицинских технологий» Российской академии медицинских наук (пос. Андреевка, Россия). Мышей содержали группами по 5 животных в клетках типа «микроизолятор». В свободном доступе мыши получали стандартный гранулированный корм и питьевую воду. Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации [17] и Директивой Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [3, 18].

2.3.2. Обработка мышей препаратами наночастиц

НЧС-ПВП и УНТ вводили животным **подкожно** (в объеме 0,2 мл, проводя иглу вдоль бедренной мышцы под кожу внутренней поверхности бедра), **внутрижелудочно** (через зонд натошак в объеме 0,2 мл) или **ингаляционно** (в аэрозольной установке СО 099С А4224 (GLAS-COL APPARATUS, США) в течение 20 мин) на протяжении 28 дней ежедневно. При ингаляционном введении аэрозоль генерировался из водной дисперсии наночастиц калиброванным стеклянным распылителем, представляющим конструктивно трубку Вентури с объемом распыляемой жидкости до 7 см³. Животные получали разведенные деионизованной водой препараты наночастиц. Вводимая доза составила 0,1 мг наночастиц на 1 кг массы тела в день. В качестве контроля использовали интактных мышей и мышей, которым вводили полимер поливинилпирролидон (ПВП) в дозе 1,9 мг/мл (в соответствии с его содержанием в препарате наночастиц серебра «Арговит») по описанной схеме аналогичными способами. На 29 сутки эксперимента мышей подвергали эвтаназии с использованием СО₂. С помощью гистологических и иммунологических методов изучались легкие, печень, почки, селезенки, паховые лимфатические узлы, сыворотка крови.

2.3.3. Мышиная модель экспериментального хронического туберкулеза

Заражение мышей линии С57В1/6 туберкулезом осуществляли введением 0,2 мл суспензии клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv внутрибрюшинно в дозе 5×10⁴ КОЕ/животное. Внутрибрюшинное заражение осуществляли с помощью шприца объемом 1 мл, используя иглы 27-30 размера, уколом в живот под углом 30-45 ° с наклоном в направлении пупка вдоль средней линии тела. Через четыре месяца животные были эвтаназированы ингаляцией СО₂ и проведена некропсия органов для микробиологических исследований. Полученные органы каждого животного по отдельности помещались в стерильные целлофановые мешочки, в которые вносили по 5 мл ЗФР с добавлением 0,05 % Твина-80. Мешочки с органами

помещали в размельчитель тканей Seward stomacher 80 (Tekmar, США) и обрабатывали в течение 2 мин. Полученную суспензию дополнительно перемешивали, отбирали по 0,5 мл и вносили в 4,5 мл ЗФР.

2.4. Гистологические методы

Легкие, печень, почки, селезенки, паховые лимфатические узлы, полученные от мышей, фиксировали 10 % нейтральным формалином. Отобранные для гистологического исследования кусочки органов обезвоживали в спиртах: этаноле и бутаноле, увеличивающейся концентрации. Пропитывали и заливали парафином. Срезы с парафиновых блоков делали на микротоме «Reichert-Jung» (Германия) и помещали на предметные стекла. Затем срезы депарафинировали в ксилоле, проводили в спиртах нисходящей концентрации, промывали водой. Окрашенные гематоксилин-эозином гистологические срезы заключали в бальзам. Исследование препаратов проводили на микроскопе Nikon Eclipse 80i (Япония), оснащенном цифровой камерой Nikon DS-U2.

2.5. Иммунологические методы

2.5.1. Получение первичных культур иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных

Получение спленоцитов

Для получения спленоцитов экспериментальных мышей эвтаназируют, стерильно вскрывают брюшную полость и изолируют селезенку. Затем селезенку стерильно гомогенизируют через капроновый фильтр в среду РПМИ-1640 («ПанЭко», Россия). Полученную суспензию отмывают центрифугированием при 250 g по 10 мин. Осадок ресуспендируют в полной питательной среде РПМИ-1640. Число жизнеспособных клеток определяют при их окрашивании трипановым синим и последующим подсчетом в автоматическом клеточном счетчике

CountessTM («Invitrogen», Корея). Количество жизнеспособных спленоцитов довели до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Клеточную суспензию спленоцитов использовали как источник лимфоцитов.

Получение макрофагов перитонеального экссудата

Перитонеальные макрофаги мыши получали с помощью промывания брюшной полости раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Для рекрутизации макрофагов в брюшную полость мышам вводили внутривентриально 2 мл мясо-пептонного бульона и через 48 ч эвтаназируют мышей декапитацией. Затем асептически вскрывают брюшину и пятикратно промывают брюшную полость $4-6 \text{ см}^3$ ФСБ, используя пинцет и пипетку. Для исключения адгезии клеток к пластику пробирку с суспензией перитонеальных клеток держали на ледяной бане. Суспензию клеток перитонеальной полости мыши центрифугировали при 250 g в течение 10 мин, затем убирали надосадочную жидкость, лизировали эритроциты добавлением 1 см^3 деионизованной воды на 15 с, тщательно перемешивая. Восстанавливали солевой баланс раствора добавлением 1 см^3 2-кратного ФСБ, снова центрифугировали и убирали надосадочную жидкость. После этого добавляли полную питательную среду (ППС) на основе DMEM, подсчитывали количество клеток в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточного счетчика CountessTM («Invitrogen», Корея), довели концентрацию до $(3-5) \times 10^6$ клеток/ см^3 . Затем полученные клетки высевали в плоскодонный 96-луночный планшет для культур тканей и оставляли на 24 ч до формирования монослоя.

Получение нейтрофилов перитонеального экссудата

Для рекрутизации нейтрофилов в брюшную полость интактным мышам вводили внутривентриально 2 мл мясо-пептонного бульона и через 2 ч эвтаназируют мышей. После декапитации и обескровливания животного асептически готовят рабочую область. Затем делают небольшое отверстие в брюшной стенке и пятикратно промывают брюшную полость холодным (плюс 4 °C) раствором Хен-

кса. Полученную из брюшной полости клеточную суспензию помещали на ледяную баню и использовали для экспериментов не позже, чем через 1 ч после получения. Число жизнеспособных клеток определяли в тесте с трипановым синим с помощью автоматического клеточного счетчика CountessTM («Invitrogen», Корея). Количество жизнеспособных нейтрофилов доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл.

Для метода МТТ нейтрофилы культивировали в полной среде DMEM (среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Gibco, США) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамин и 0,2 % бикарбоната натрия) при температуре 37 °С и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе.

2.5.2. Методы исследования функциональной активности иммунокомпетентных клеток

Оценка жизнеспособности иммунокомпетентных клеток в МТТ-тесте

Цитотоксичность наночастиц изучали на спленоцитах, перитонеальных макрофагах и нейтрофилах, полученных от экспериментальных животных, как указано выше, используя метод МТТ [129]. Колориметрический тест МТТ основан на способности дегидрогеназ митохондрий восстанавливать желтый МТТ (3-(4,5-диметитиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолий бромид) до синего формазана. Реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами. Густота синей окраски коррелирует с жизнеспособностью клеточного монослоя. Спленоциты, макрофаги и нейтрофилы каждой группы мышей инкубировали в 96-луночных планшетах для культур клеток при температуре 37 °С и 5 % CO₂ до образования монослоя, затем в лунки добавляли раствор МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали в течение 4 ч при температуре 37 °С и 5 % CO₂. После окончания инкубирования к клеточному монослою добавляли 10 % додецилсульфат натрия

(ДСН), приготовленный на 0,01 М соляной кислоте, и измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 595 нм на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия). Процент жизнеспособных клеток рассчитывался как отношение оптической плотности опытных лунок к оптической плотности контрольных лунок, умноженный на 100.

Оценка продукции активных форм кислорода фагоцитами методом хемилюминесценции

Воздействие наночастиц на бактерицидную функцию фагоцитов (способность к «окислительному взрыву») изучали на нейтрофилах, полученных от экспериментальных животных, как указано выше, используя наиболее чувствительный и информативный метод хемилюминесценции (ХЛ). При активации фагоциты генерируют активные формы кислорода, что может быть обнаружено с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции. Активация фагоцитирующей клетки запускает сложный каскад физиологических и метаболических процессов, включая образование супероксидных радикалов при переносе электрона с НАДФН на O_2 . В основе метода люминолзависимой ХЛ лежит окисление люминола активными формами кислорода и хлора и взаимодействие окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода. Для усиления хемилюминесценции применялся раствор люминола с концентрацией $5,6 \times 10^{-4}$ М (BioChemika, Чехия). Для активации фагоцитов был использован опсонизированный мышинной сывороткой зимозан («Sigma», США). В качестве контроля были взяты нейтрофилы интактных мышей.

Для постановки реакции в каждую лунку 96-луночного планшета вносили суспензию нейтрофилов так, чтобы конечная концентрация составила $0,5 \times 10^6$ кл/мл, затем добавляли суспензию зимозана в концентрации 2 мг/мл по 0,02 мл в лунку и $5,6 \times 10^{-4}$ М раствора люминола по 0,02 мл в лунку. Планшеты помещали в универсальный планшетный многофункциональный анализатор Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия) и проводили измерение хемилюминес-

ценции при температуре 37 °С в течение часа. Значение хемиллюминесценции измерялось 6 раз, длительность одного измерения составляла 10 мин. Уровень хемиллюминесценции выражали количеством импульсов, накопленных за одно измерение.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов и количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов селезенки методами проточной цитофлюориметрии

Спленоциты (5×10^6 кл/мл) опытных и контрольных групп мышей окрашивали моноклональными антителами к CD3 PerCP, CD4 APC, CD8 PE, CD19 APC (eBioscience, США) в течение 20 мин в темноте при температуре 20 °С в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы отмывали в фосфатно-солевом буфере и фиксировали 1 % раствором формалина.

Для определения количества Т-лимфоцитов с внутриклеточной экспрессией интерферон-гамма (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α) за 4 ч до окрашивания моноклональными антителами к спленоцитам добавляли ингибитор белкового транспорта BD GolgiPlug (BD Biosciences, США), содержащий брефелдин А. Затем клеточную суспензию фиксировали и пермеабелизировали добавлением BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) и последующей отмывкой фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,5 % сапонина. После чего клетки окрашивали моноклональными антителами против CD3, ИФН- γ , ФНО- α (eBioscience, США), инкубировали еще 20 мин и затем отмывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,5 % сапонина [50, 90].

Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток. Процентное содержание субпопуляций клеток в образцах определяли с использованием программы «CellQuest Pro».

Определение количества ИФН- γ и ФНО- α в биологических жидкостях

Определение количества ИФН- γ и ФНО- α в надосадочной жидкости первичной культуры спленоцитов мышей, в сыворотке крови и жидкости бронхолегочного лаважа мышей проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Mouse IFN- γ ELISA» и «TNF- α ELISA» (Bender MedSystems, Австрия) в соответствии с руководством производителя. Измерение оптической плотности проводили на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 450 нм.

Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

У мышей, ингаляционно обработанных наночастицами серебра препарата «Арговит» и углеродными нанотрубками, извлекали легкие и бронхи и промывали их физиологическим раствором. Затем определяли количество белка, содержащегося в промывной жидкости с использованием набора PierceTM BCA Protein Assay Kit (Sigma, США). Измерение оптической плотности проводили на планшетном многофункциональном анализаторе Victor X3 2030 (Perkin Elmer, Финляндия) при длине волны 562 нм.

2.6. Микроскопические методы

2.6.1. Электронная микроскопия

Определение физических параметров (форма, размер) наночастиц проводили, используя методы просвечивающей электронной микроскопии. Для препарирования электронно-микроскопических образцов готовили раствор препарата (С, растворитель) и затем наносили на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой (коллодиевой) пленкой, с последующим окрашиванием 2 % раствором уранил ацетата в течение 1 минуты. Полученные таким образом образцы анализировали на электронном микроскопе «Hitachi» H-500 (Япония) с использо-

ванием техники негативного контрастирования при ускоряющем напряжении 75 кВ. Статистический анализ размеров наночастиц был проведен с использованием программного обеспечения Image Scope M методом автоматического подсчета объектов интереса по морфометрическим признакам.

2.6.2. Атомно-силовая микроскопия

Метод атомно-силовой микроскопии использовали для изучения морфологии (формы и размеров) и особенностей строения поверхности наночастиц, их распределение и взаимодействие частиц между собой в коллоидном растворе. Метод АСМ использовали параллельно с методом просвечивающей электронной микроскопии.

Исследование образцов проводили на сканирующем зондовом микроскопе «Smart SPM» («АИСТ-НТ», Россия) с использованием кантилеверов fpN11 («Нанотюнинг», Россия), радиус кривизны 10-25 нм. Для изучения наночастиц методом атомно-силовой микроскопии нами использовалась следующая методика приготовления образца.

Непосредственно перед исследованием готовили два разведения наночастиц. Для этого исходную суспензию наночастиц разводили водой в соотношении 1:5 и 1:10. С помощью автоматической пипетки исследуемый материал помещали на поверхность свежесколотой слюды («SPI Supplies, Structure Probe», США) в объеме 3 мкл таким образом, чтобы получилась слегка выпуклая капля, не выходящая за границы слюды. Пробы высушивали при комнатной температуре до полного удаления жидкости (около 3-4 мин). Высушенный препарат помещали на держатель образцов и устанавливали на сканер микроскопа. Наблюдения проводили в режиме бесконтактной (Non Contact) атомно-силовой микроскопии. Поле сканирования варьировалось в пределах от 100×100 нм до 5×5 мкм. Используя панель управления микроскопом, устанавливали следующие параметры измерения: скорость сканирования – 1,2 Гц, начальная амплитуда колебаний кантилевера – 10 нм.

В процессе сканирования выбирали поле с равномерным распределением наночастиц и с помощью панели управления микроскопом устанавливали исходную границу рабочего поля. Препарат перемещали по осям X и Y и при появлении в поле зрения наночастиц производили их учет.

Просмотренное поле смещали за пределы «видимости» системы регистрации прибора и просматривали следующую часть препарата. Всего делали 5 определений каждого образца. Полученные изображения анализировали, используя программу «Gwiddion» (Czech Metrology Institute, Чехия).

2.7. 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

Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

3.1. Определение физических параметров наночастиц серебра и углеродных нанотрубок

В научной литературе имеются данные о том, что размер наночастиц, площадь их поверхности, поверхностная функционализация и химия наночастиц, стабильность в растворе и способность к агрегации являются основными факторами, влияющими на биокинетику наночастиц и, следовательно, на их токсичность [32, 134, 137]. Зависимость степени токсических эффектов наночастиц серебра от их размера показана как на отдельных клетках в условиях *in vitro* [99], так и на организме в целом в экспериментах *in vivo* [37]. Бактерицидная активность наночастиц серебра и углеродных нанотрубок также во многом связана с их физико-химическими параметрами [29, 47, 60, 117, 120, 201]. Поэтому первым шагом в изучении наночастиц серебра и углеродных нанотрубок было определение их физических параметров (размер, форма) методами электронной и атомно-силовой микроскопии.

Результаты анализа микрофотографий НЧС-ПВП позволили заключить, что данные наночастицы представлены частицами округлой формы и равномерно распределены в растворе (рисунок 1). Диаметр наибольшего процента наночастиц серебра варьировал в пределах от 25 до 75 нм, из которых 30 % составляли наночастицы с диаметром 25 нм, а 28 % – с диаметром 50 нм. Средний диаметр наночастиц серебра в препарате составил $(43,6 \pm 10,7)$ нм (рисунок 2).

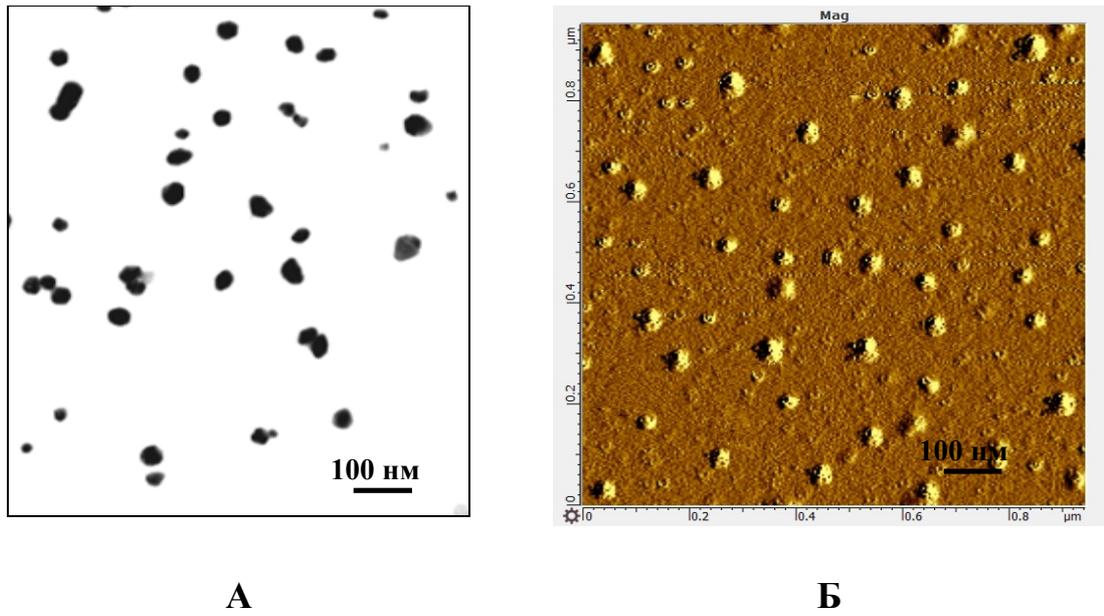


Рисунок 1 – Микрофотографии НЧС-ПВП, полученные на электронном «Hitachi» H-500 (Япония) (А) и атомно-силовом «Smart SPM» «АИСТ-НТ» (Россия) (Б) микроскопах

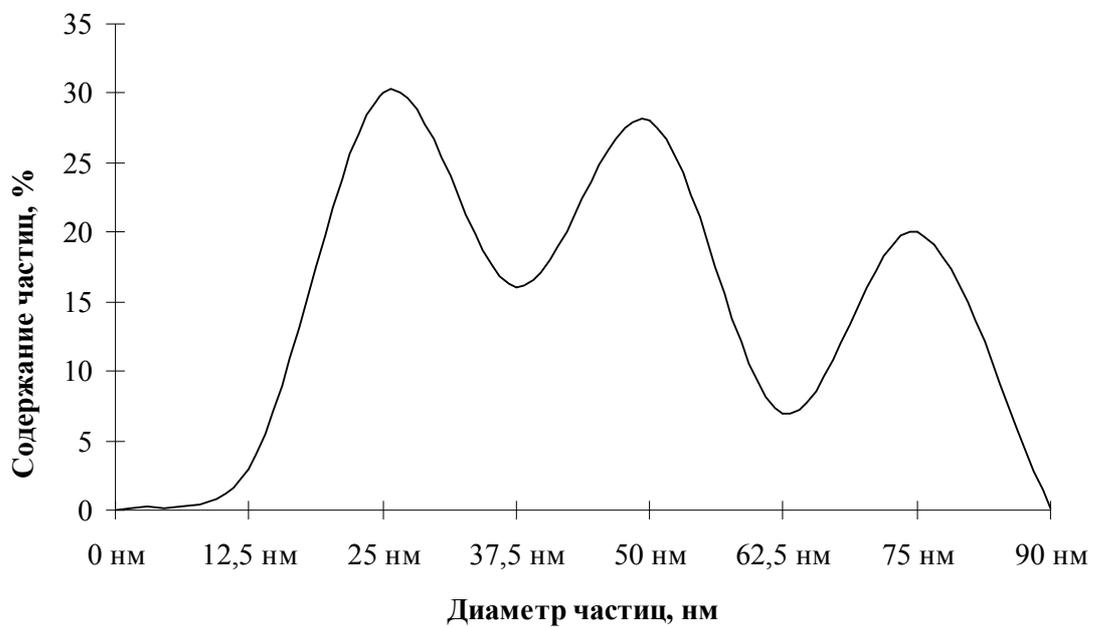


Рисунок 2 – Распределение НЧС-ПВП по диаметру

На рисунке 3 представлены микрофотографии НЧС (Plasma Chem, Германия), полученные на электронном и атомно-силовом микроскопах. Результаты анализа позволили подтвердить данные производителя, что наночастицы серебра имеют округлую форму и средний размер $(10,3 \pm 5,6)$ нм. Кроме того, как видно на рисунке, данные НЧС менее стабильны в растворе и способны к агрегации.

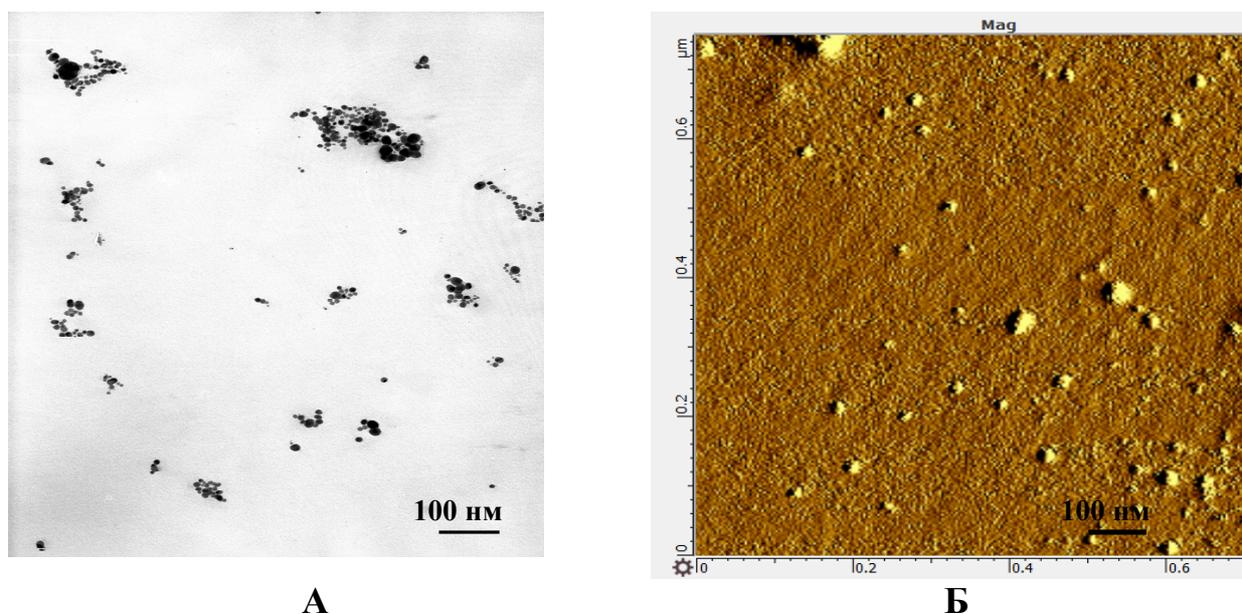


Рисунок 3 – Микрофотографии НЧС, полученные на электронном «Hitachi» H-500 (Япония) (А) и атомно-силовом «Smart SPM» «АИСТ-НТ» (Россия) (Б) микроскопах

По данным электронной и атомно-силовой микроскопии углеродные нанотрубки имели диаметр $(36,2 \pm 4,8)$ нм. Также встречались крупные агрегаты трубчатой формы 5-10 % (рисунок 4).

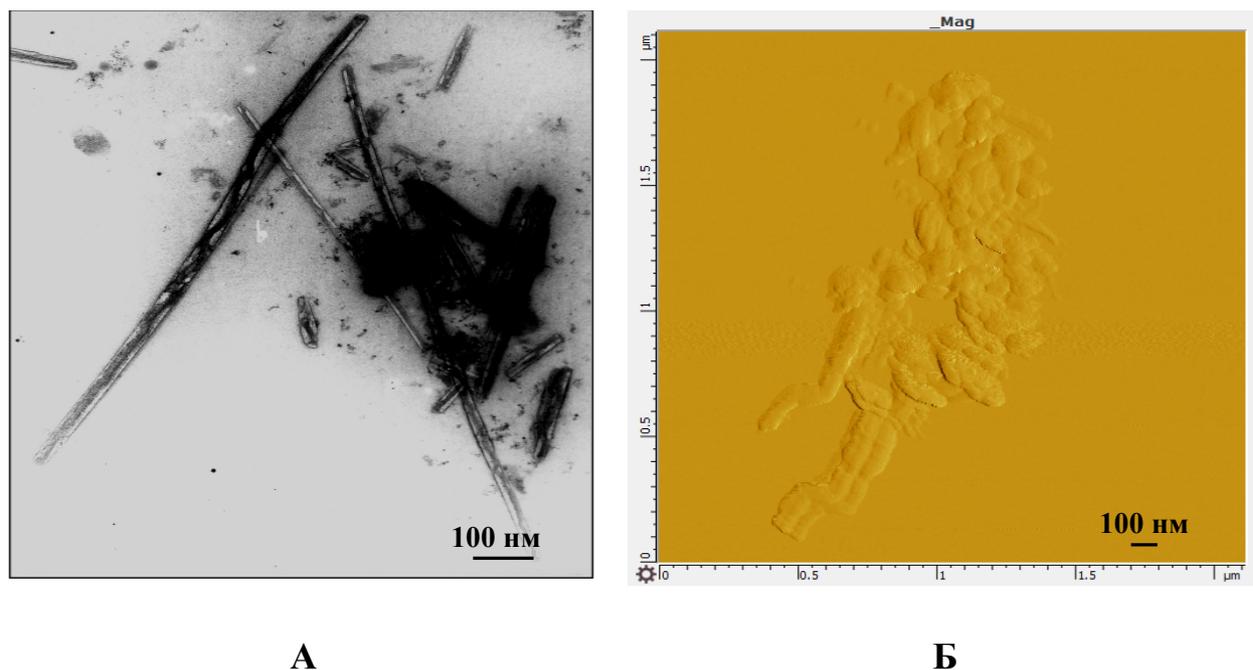


Рисунок 4 – Микрофотографии углеродных нанотрубок, полученные на электронном «Hitachi» H-500 (Япония) (А) и атомно-силовом «Smart SPM» «АИСТ-НТ» (Россия) (Б) микроскопах

Таким образом, были получены следующие результаты: НЧС имели округлую форму и средний диаметр $(10,3 \pm 5,6)$ нм. НЧС-ПВП также имели округлую форму и средний диаметр $(43,6 \pm 10,7)$ нм. Углеродные нанотрубки имели диаметр $(36,2 \pm 4,8)$ нм. Наибольшей способностью к агрегации обладали углеродные нанотрубки, были обнаружены крупные агрегаты трубчатой формы. Меньше агрегировали НЧС. Но более стабильным оказался препарат, содержащий НЧС-ПВП, наночастицы в его составе были равномерно распределены.

3.2. Изучение бактерицидной активности наночастиц серебра и углеродных нанотрубок в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Salmonella enterica* 4412, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в экспериментах *in vitro*

3.2.1. Изучение бактерицидного действия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, в отношении *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ *in vitro*

Нами были проведены экспериментальные исследования бактерицидного действия НЧС-ПВП на грамположительные и грамотрицательные бактерии в условиях *in vitro*. Для изучения бактерицидной активности данных наночастиц были выбраны следующие штаммы микроорганизмов: *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Бактерицидная эффективность НЧС-ПВП, %*

Штамм	Концентрация НЧС-ПВП, мг/л				
	50	25	10	1	0,1
<i>S. enterica</i> 4412	75,02±6,75	69,43±5,12	69,05±4,89	64,56±4,43	2,03±0,18
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	96,24±4,98	92,18±5,21	35,62±5,54	31,05±4,77	1,12±0,13
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	55,12±4,51	36,25±2,83	31,15±2,55	3,53±0,29	2,42±0,21

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

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что наибольшую бактерицидную активность НЧС-ПВП проявлял относительно бактериального штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Бактерицидная эффективность в максимально взятой нами концентрации препарата 50 мг/л составила (96,24±4,98) %. Для штамма *S. enterica* 4412 она составила (75,02±6,75) %, а для *M. tuberculosis* H37Rv

– (55,12±4,51) %. Уменьшение концентрации исследуемого препарата в 2 раза (25 мг/л) вызывало меньшую бактерицидную эффективность: для *F. tularensis* 15 НИИЭГ – (92,18±5,21) %; для *S. enterica* 4412 – (69,43±5,12) %; для *M. tuberculosis* H37Rv – (36,25±2,83) % (таблица 1). Мы отметили дозозависимое снижение бактерицидной эффективности НЧС-ПВП.

В результате проведенных экспериментальных исследований бактерицидной эффективности НЧС-ПВП установлено, что данный препарат ингибирует рост бактериальных грамотрицательных и грамположительных патогенов, таких как *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *M. tuberculosis* H37Rv.

3.2.2. Изучение бактерицидного действия наночастиц серебра без покрытия в отношении *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ *in vitro*

В таблице 2 показано воздействие НЧС на рост штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Таблица 2 – Бактерицидная эффективность НЧС, %*

Штамм	Концентрация НЧС, мг/л				
	50	25	10	1	0,1
<i>S. enterica</i> 4412	51,25±5,25	43,49±5,24	40,72±4,64	0	0
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	71,82±6,15	53,04±5,86	31,05±4,92	12,21±1,17	0
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	30,61±4,31	24,23±2,45	20,04±2,17	8,56±0,96	0

Примечание – * – Бактерицидная эффективность рассчитывалась по показателям погибших КОЕ относительно контроля (образца без добавления НЧС) в процентном соотношении.

Наибольшее подавляющее действие НЧС оказывали на рост штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Бактерицидная эффективность в максимально взятой нами концентрации НЧС 50 мг/л составила (71,82±6,15) %. Для штамма *S. enterica* 4412 она составила (51,25±5,25) %, а для *M. tuberculosis* H37Rv – (30,61±4,31) %. Уменьшение концентрации НЧС в 2 раза (25 мг/л) вызывало

меньшую бактерицидную эффективность (таблица 2). Нами было также отмечено дозозависимое снижение бактерицидной эффективности НЧС.

3.2.3. Изучение бактерицидного действия углеродных нанотрубок в отношении *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ *in vitro*

Для полного сравнения тестируемых в нашей работе наночастиц было проведено изучение воздействия УНТ на рост штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ *in vitro*. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Бактерицидная эффективность углеродных нанотрубок, %*

Штамм	Концентрация УНТ, мг/л				
	50	25	10	1	0,1
<i>S. enterica</i> 4412	16,21±2,37	17,61±2,87	5,63±1,57	3,52±1,38	0
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	13,23±1,57	0	3,17±1,07	0,26±0,14	0
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	21,27±2,97	17,53±2,63	9,62±2,23	4,47±1,26	0

Примечание – * – Бактерицидная эффективность рассчитывалась по показателям погибших КОЕ относительно контроля (образца без добавления УНТ) в процентном соотношении.

Как видно из таблицы углеродные нанотрубки не обладали бактерицидной эффективностью, сравнимой с бактерицидностью наночастиц серебра относительно изученных бактериальных штаммов (таблица 3).

3.3. Заключение по Главе 3

Данная глава посвящена характеристике физических параметров наночастиц серебра и углеродных нанотрубок, а также изучению их бактерицидной активности в отношении патогенных бактериальных штаммов *M. tuberculosis* H37Rv, *S. enterica* 4412, *F. tularensis* 15 НИИЭГ в экспериментах *in vitro*. Было выявлено, что НЧС-ПВП и НЧС имели округлую форму и равномерно распределялись в растворе. Углеродные нанотрубки обладали наибольшей способностью к

агрегации и образовывали в растворе агрегаты трубчатой формы. Средний диаметр НЧС составил $(10,3 \pm 5,6)$ нм, НЧС-ПВП – $(43,6 \pm 10,7)$ нм, УНТ – $(36,2 \pm 4,8)$ нм.

Изучение бактерицидной активности НЧС-ПВП, НЧС и УНТ показало, что более выраженным бактерицидным эффектом против исследованных грамположительных и грамотрицательных бактерий обладали НЧС-ПВП, вызывая в концентрации 50 мг/л гибель $(55,12 \pm 4,51)$ % КОЕ *M. tuberculosis* H37Rv, $(75,02 \pm 6,75)$ % КОЕ *S. enterica* 4412 и $(96,24 \pm 4,98)$ % КОЕ *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Наиболее чувствительным к действию данных наночастиц оказался бактериальный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, что согласуется с научными работами других исследователей. В работе Egger *et al.*, 2009 показано, что грамотрицательные бактерии более чувствительны к действию наносеребра по сравнению с грамположительными бактериями [59]. Клеточная стенка грамположительных бактерий содержит гораздо больше муреина и пептидогликана, что делает ее отрицательно заряженной. Из-за отрицательного заряда клеточной стенки грамположительных бактерий намного больше катионов серебра сохраняются в стенке, что и предотвращает их проникновение в клетку [46].

Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Методы исследования *in vitro* на настоящий момент занимают важное место в изучении токсичности наночастиц. Одним из основных преимуществ методов *in vitro* является то, что они позволяют в строго контролируемых условиях изолировать и изучать отдельные биологические процессы, что невыполнимо в экспериментах на живом организме. Эксперименты *in vitro* позволяют также проводить скрининговые исследования, то есть позволяют тестировать одновременно большое количество препаратов за более короткое время. Токсикокинетические данные *in vitro* используются для выбора соответствующих мишеней среди клеток и систем организма и выбора вероятных доз наноматериалов для последующего исследования на животных моделях.

Существующие методики *in vitro* позволяют осуществлять количественную оценку цитотоксичности изучаемых наноматериалов с помощью метаболических маркеров жизнеспособности клетки. Для оценки митохондриального дыхания широко применяют метод восстановления солей тетразолия (МТТ), для оценки мембранных маркеров – захват красителя нейтрального красного лизосомами, прижизненная окраска трипановым синим. Для регистрации провоспалительного цитокинового ответа определяют количество ФНО- α и ИФН- γ иммуноферментным методом.

4.1. Изучение цитотоксических свойств наночастиц серебра и углеродных нанотрубок

Цитотоксичность наночастиц оценивали по изменению метаболической активности митохондриальных ферментов спленоцитов, перитонеальных нейтрофи-

лов и макрофагов в МТТ-тесте [129]. Принцип метода МТТ основан на способности фермента сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны клеток млекопитающих восстанавливать желтую соль 3-[4,5-диметитиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Интенсивность превращения МТТ в формазан отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток и модулируется активностью сопряженных ферментных систем, например, дыхательной цепи переноса электронов. Таким образом, по интенсивности накопления кристаллов формазана в цитоплазме можно судить об уровне митохондриального дыхания клетки, что является косвенной мерой жизнеспособности клеточной популяции, а также доказательством неповрежденности митохондриальной дыхательной цепи.

Спленоциты, перитонеальные нейтрофилы и макрофаги, полученные от интактных мышей, инкубировали в присутствии наночастиц в течение 24, 48 и 72 ч в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂, 95 % влажности). После чего производили оценку результатов. Процент жизнеспособных клеток рассчитывался как отношение оптической плотности опытных лунок к оптической плотности контрольных лунок, умноженный на 100. В контрольных лунках клетки инкубировались в питательной среде без добавления наночастиц. На рисунке 5 представлены результаты исследования воздействия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на метаболическую активность перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/C МТТ-тестом.

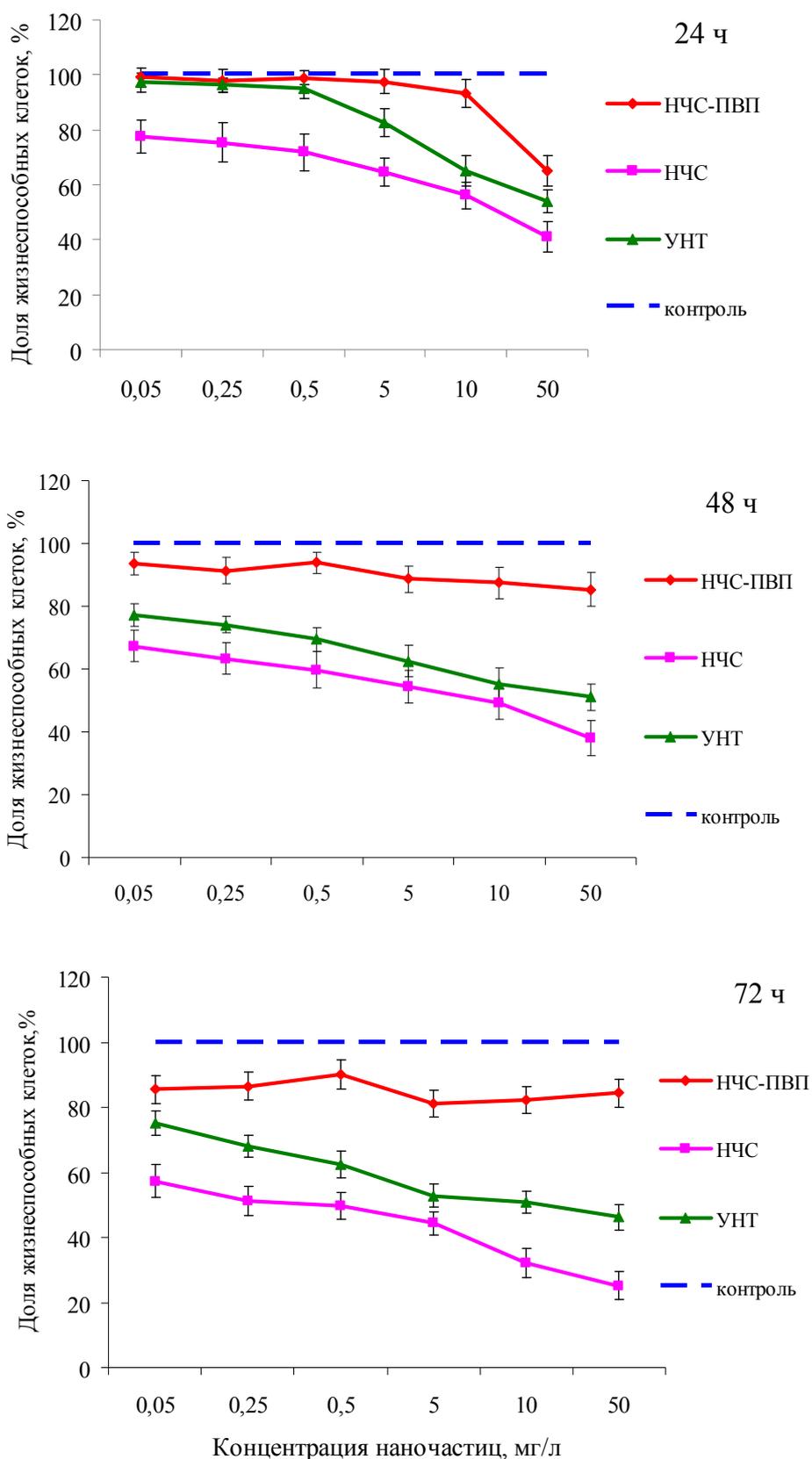


Рисунок 5 – Цитотоксическое воздействие наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на метаболическую активность перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/C в МТТ-тесте

Как видно из рисунка 5, наименьшее цитотоксическое воздействие на митохондриальную активность перитонеальных макрофагов оказывали НЧС-ПВП. Снижение активности митохондриальных дегидрогеназ макрофагов на 35 % в присутствии НЧС-ПВП наблюдалось только через 24 ч при самой высокой тестовой концентрации 50 мг/л, но уже к 48-72 ч инкубации не отличалась от показателей контрольных клеток, что свидетельствует об отсутствии ингибирующей активности препарата на ферментную систему клеток.

А наиболее цитотоксичными для макрофагов оказались НЧС, т.к. даже в минимально взятой нами концентрации 0,05 мг/л через 24 ч снижали митохондриальную активность на 23 %. Наблюдалось время- и дозозависимое увеличение цитотоксического действия данных НЧС (рисунок 5).

Углеродные нанотрубки не оказывали цитотоксического воздействия на мышечные макрофаги в низких концентрациях, таких как 0,05; 0,25 и 0,5 мг/л. Однако данные наночастицы в концентрации 5 мг/л снижали метаболическую активность макрофагов на 17 % через 24 ч инкубации. При увеличении концентрации и времени инкубации углеродные нанотрубки оказывали большую цитотоксичность, в среднем снижая митохондриальную активность макрофагов на 50 % (рисунок 5).

При изучении воздействия НЧС-ПВП, НЧС и УНТ на митохондриальную активность перитонеальных нейтрофилов и спленоцитов мышей были получены аналогичные результаты: наибольшую цитотоксичность показали НЧС (таблицы 4-6).

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что НЧС наиболее цитотоксичны для иммунокомпетентных клеток мыши.

Таблица 4 – Жизнеспособность иммунных клеток после воздействия НЧС-ПВП *in vitro*

Тип клеток	Время инкубации, ч	Концентрация, мг/л / Доля жизнеспособных клеток, %					
		0,05	0,25	0,5	5	10	50
макрофаги	24	99,03±3,54	97,82±4,15	98,91±2,45	97,54±4,25	93,24±3,17	65,19±4,47
	48	93,74±4,27	91,32±5,12	93,86±3,54	88,71±6,04	87,45±5,78	85,32±6,73
	72	85,44±4,96	86,41±5,38	90,23±4,23	81,17±5,62	82,23±4,83	84,32±5,76
нейтрофилы	24	88,43±4,87	83,14±4,34	81,54±5,06	80,93±3,89	79,59±4,02	76,98±3,17
	48	79,64±6,24	67,53±5,23	59,05±4,76	66,13±5,02	59,36±4,31	52,04±3,87
	72	73,68±4,15	71,13±3,59	64,27±3,98	62,31±4,05	59,04±3,42	55,26±3,07
спленоциты	24	98,45±4,78	95,38±4,56	96,05±4,89	95,13±5,09	92,41±4,23	84,58±4,53
	48	93,13±4,67	88,56±4,01	89,74±4,95	79,94±3,96	82,62±4,21	74,53±3,84
	72	86,06±4,31	82,72±3,69	85,95±4,13	76,47±3,58	75,61±3,92	69,94±3,25

Таблица 5 – Жизнеспособность иммунных клеток после воздействия НЧС *in vitro*

Тип клеток	Время инкубации, ч	Концентрация, мг/л / Доля жизнеспособных клеток, %					
		0,05	0,25	0,5	5	10	50
макрофаги	24	77,38 ± 5,94	75,41 ± 7,01	71,78 ± 6,79	64,45 ± 5,13	56,11 ± 4,87	41,12 ± 5,54
	48	67,38 ± 5,02	63,23 ± 5,73	59,77 ± 4,26	54,45 ± 4,76	49,04 ± 4,12	38,13 ± 4,42
	72	57,38 ± 4,98	51,23 ± 5,36	49,77 ± 4,06	44,45 ± 4,48	32,12 ± 4,75	25,18 ± 3,76
нейтрофилы	24	78,65 ± 5,23	77,62 ± 5,86	73,14 ± 6,34	68,12 ± 4,75	63,32 ± 4,14	57,86 ± 4,62
	48	61,34 ± 5,07	56,38 ± 4,76	51,95 ± 4,23	48,12 ± 3,52	41,34 ± 3,12	29,07 ± 3,54
	72	50,83 ± 4,95	45,49 ± 5,04	41,43 ± 4,37	38,49 ± 2,54	27,23 ± 2,87	21,67 ± 3,54
спленоциты	24	76,45 ± 4,23	75,64 ± 4,31	75,97 ± 3,95	65,23 ± 3,67	55,74 ± 4,12	42,12 ± 3,05
	48	65,42 ± 4,27	61,78 ± 3,12	59,05 ± 3,99	54,31 ± 3,06	48,95 ± 3,52	36,96 ± 3,03
	72	55,87 ± 3,98	56,45 ± 3,26	52,74 ± 3,96	45,32 ± 2,67	33,65 ± 2,54	28,65 ± 2,45

Таблица 6 – Жизнеспособность иммунных клеток после воздействия углеродных нанотрубок *in vitro*.

Тип клеток	Время инкубации, ч	Концентрация, мг/л / Доля жизнеспособных клеток, %					
		0,05	0,25	0,5	5	10	50
макрофаги	24	97,24 ± 3,45	96,47 ± 2,58	95,13 ± 3,78	82,56 ± 4,96	65,04 ± 5,43	54,02 ± 4,12
	48	77,21 ± 5,45	74,12 ± 4,98	69,51 ± 4,62	62,55 ± 5,03	55,12 ± 4,14	51,03 ± 3,76
	72	75,23 ± 4,75	68,12 ± 4,63	62,51 ± 4,23	52,85 ± 4,01	50,82 ± 3,67	46,23 ± 3,21
нейтрофилы	24	85,77 ± 4,34	84,45 ± 4,65	80,34 ± 4,39	76,12 ± 4,04	70,54 ± 3,56	68,96 ± 3,87
	48	67,45 ± 4,23	68,34 ± 4,05	64,01 ± 4,65	59,54 ± 3,98	52,13 ± 3,24	49,05 ± 2,67
	72	60,33 ± 3,63	57,92 ± 3,32	55,41 ± 3,43	50,32 ± 2,98	47,84 ± 2,45	44,65 ± 2,06
спленоциты	24	98,12 ± 3,76	95,54 ± 4,23	94,13 ± 3,54	81,48 ± 4,32	64,76 ± 5,37	52,58 ± 3,44
	48	76,45 ± 5,42	73,96 ± 4,67	65,74 ± 4,21	60,64 ± 4,25	54,96 ± 3,98	50,63 ± 3,43
	72	75,85 ± 4,23	65,98 ± 4,21	64,98 ± 4,31	60,65 ± 4,68	52,65 ± 3,95	44,98 ± 3,01

4.2. Изучение влияния наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами перитонеального экссудата мышей

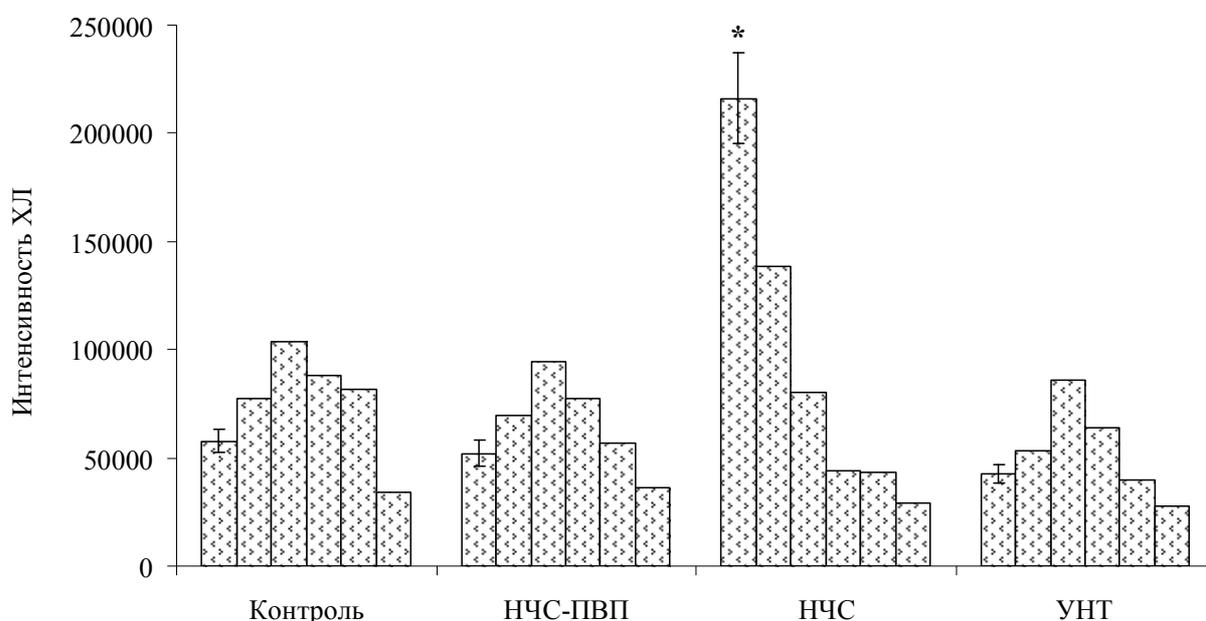
Главным источником активных форм кислорода (АФК) в организме человека и животных служат клетки, обладающие фагоцитарной активностью. К ним относятся нейтрофильные гранулоциты и макрофаги. При активации фагоциты высвобождают производные кислорода, что может быть обнаружено с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции. Непосредственной причиной хемилюминесценции активированных фагоцитов считают образование синглетного кислорода в реакциях между кислородными радикалами, перекисью водорода и гипохлоритом. Хемилюминесцентный анализ клеток этих типов позволяет исследовать механизмы их активации, а также оценить иммунореактивность организма под влиянием иммунодепрессивных и иммуностимулирующих воздействий.

Изучение метаболизма нейтрофилов с помощью хемилюминесценции широко используется научными исследователями. Также оценка изменения метаболизма нейтрофилов имеет клиническое значение [54]. Метод хемилюминесценции используется для прогнозирования течения инфекционных заболеваний, изучения антимикробной активности пероксидазной системы нейтрофилов, оценки влияния лекарственных препаратов на метаболизм данных клеток [54, 146, 154].

Мы изучали изменения продукции активных форм кислорода в метаболизме перитонеальных нейтрофилов под влиянием наночастиц хемилюминесцентным анализом. Для этого мы оценивали интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов интактных мышей в присутствии тестируемых наночастиц, а также хемилюминесцентный ответ данных клеток при индукции «окислительного взрыва» в присутствии наночастиц *in vitro*. В качестве индуктора «окислительного взрыва» использовался зимозан, опсонизированный мышиной сывороткой. Хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на зимозан, опсонизированный мышиной сыво-

роткой, моделирует ответ фагоцитов на чужеродный патоген и отражает бактерицидный потенциал нейтрофилов. В качестве контроля были взяты перитонеальные нейтрофилы интактных мышей, не обработанные наночастицами.

Уровень продукции 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 активных форм кислорода перитонеальными нейтрофилами мыши в 3,75 раза, что может приводить к окислительному стрессу в клетках (рис. 6). НЧС-ПВП и УНТ в концентрации 100 мг/мл не вызывали изменения продукции АФК нейтрофилами (рис. 6).

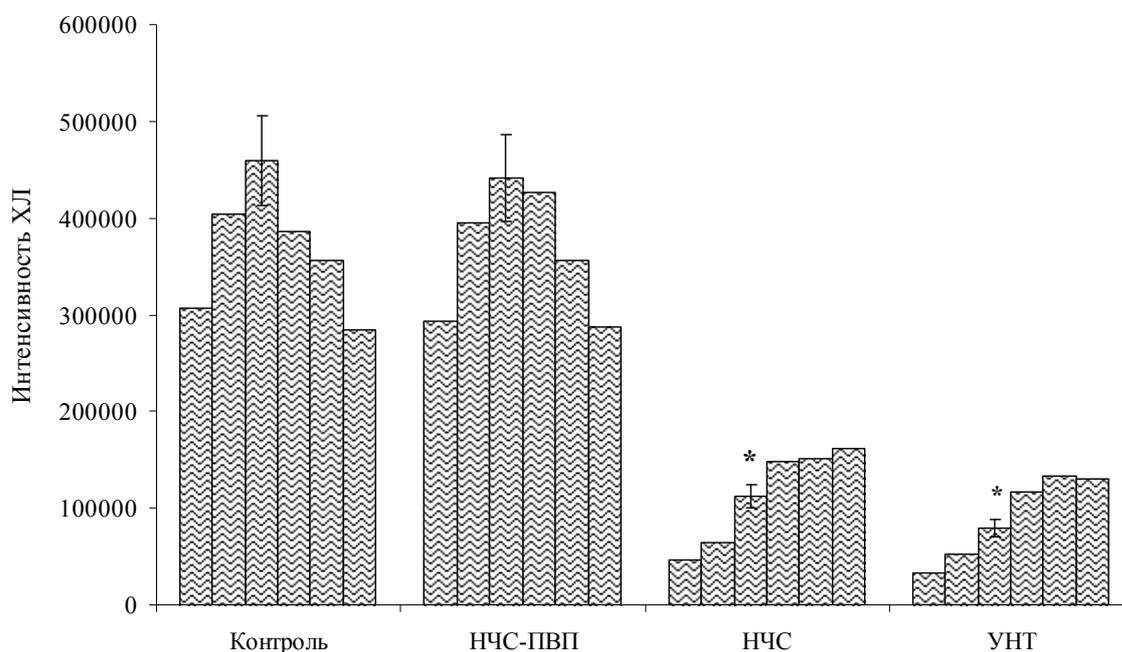


* – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P < 0,001$)
 Значение ХЛ измерялось 6 раз, длительность одного измерения 10 мин.
 Концентрация люминола $5,6 \times 10^{-4}$ М

Рисунок 6 – Хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на добавление наночастиц в концентрации 100 мг/л

Хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на зимозан, опсонизированный мышинной сывороткой, в присутствии НЧС-ПВП в концентрации 100 мг/л не от-

личался от контрольных клеток. НЧС и УНТ (100 мг/л) снижали уровень индукции активных форм кислорода нейтрофилами в присутствии зимозана в 4 и 5,8 раз соответственно ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рисунок 7).



* – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P < 0,001$)

Значение ХЛ измерялось 6 раз, длительность одного измерения 10 мин.

Концентрация люминола $5,6 \times 10^{-4}$ М.

Рисунок 7 – Хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на зимозан в присутствии наночастиц в концентрации 100 мг/л

Таким образом, НЧС-ПВП не индуцировали развитие окислительного стресса в клетках и не снижали бактерицидную способность нейтрофилов. НЧС индуцировали продукцию АФК, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в клетках и скорее всего, является причиной снижения бактерицидного потенциала нейтрофилов.

4.3. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию провоспалительных цитокинов спленоцитами мыши в условиях *in vitro*

При исследовании воздействия наночастиц на метаболическую активность и продукцию АФК нами было показано, что НЧС и УНТ вызывают более выраженные цитотоксические эффекты по сравнению с НЧС-ПВП. В научной литературе имеются данные о том, что у НЧС без покрытия цитотоксичность может быть опосредована через окислительный стресс, в то время как НЧС, покрытые ПВП, вызывают токсические эффекты через воспалительные пути путем усиления продукции цитокинов [135].

В нашей работе НЧС-ПВП не вызывали окислительного стресса в клетках в отличие от НЧС. Поэтому для изучения, возможно, другого механизма цитотоксичности нами были проведены эксперименты по изучению влияния НЧС-ПВП на продукцию провоспалительных цитокинов спленоцитами.

К спленоцитам интактных мышей добавляли НЧС-ПВП *in vitro* в различных концентрациях: 0,5 мг/л; 1 мг/л; 2,5 мг/л; 5 мг/л; 10 мг/л; 25 мг/л; 50 мг/л. Затем клетки в присутствии наночастиц инкубировали 24; 48 и 72 ч. По истечению необходимого периода отбирали надосадочную жидкость и определяли содержание цитокинов ИФН- γ и ФНО- α методом ELISA (готовым набором Mouse IFN- γ ELISA, Bender MedSystems, Австрия). Измерение оптической плотности проводили на универсальном сканере Perkin Elmer на длине волны 450 нм.

Оценка воздействия НЧС-ПВП на продукцию провоспалительных цитокинов показала, что данные наночастицы не влияют на выработку ИФН- γ и ФНО- α лимфоцитами *in vitro*.

4.4. Заключение по Главе 4

Данная глава посвящена характеристике физических параметров наночастиц серебра и углеродных нанотрубок, а также изучению их воздействия на иммунные клетки в экспериментах *in vitro*. При изучении цитотоксического воздействия наночастиц на иммунные клетки нами было обнаружено, что НЧС и УНТ снижали активность митохондриальных ферментов мышинных макрофагов. По литературным данным НЧС обладают повреждающим действием на митохондрии. Так, в своей работе Hussain с соавт. (2005) показали, что наночастицы серебра (15 и 100 нм) в концентрации 5-50 мг/л вызывали значительное нарушение митохондриальных функций и снижение мембранного потенциала митохондрий клеток крысиной печеночной линии BRL 3A.

НЧС-ПВП при всех изученных нами концентрациях, кроме самой высокой (50 мг/л) не снижали активность митохондриальных дегидрогеназ макрофагов в течение 24 ч инкубации. Активность митохондриальных ферментов макрофагов в присутствии НЧС-ПВП при самой высокой тестовой концентрации 50 мг/л снижалась через 24 ч, но к 48-72 ч инкубации не отличалась от показателей контрольных клеток.

При изучении метаболической активности нейтрофилов в присутствии всех тестовых наночастиц было обнаружено снижение активности митохондриальных дегидрогеназ. Это можно объяснить тем, что нейтрофилы обладают отличным от макрофагов механизмом фагоцитирования. После поглощения частиц нейтрофилы погибают, а макрофаги нет. Культура спленоцитов является гетерогенной. Эксперименты на данных клетках показали, что НЧС-ПВП не вызывали изменений активности митохондриальных дегидрогеназ. Воздействие НЧС и УНТ вызывало снижение данного показателя.

Согласно ряду научных работ ведущим механизмом цитотоксичности наночастиц серебра является индукция свободных радикалов кислорода [36, 66, 81]. Наши исследования показали, что НЧС-ПВП не индуцировали продукцию актив-

ных форм кислорода, а следовательно не вызывали развитие окислительного стресса в клетках и не снижали бактерицидную способность нейтрофилов. НЧС увеличивали продукцию АФК, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в клетках. Уровень хемилюминесцентного ответа на зимозан, опсонизированный мышинной сывороткой, снижался под действием НЧС и УНТ. Это может быть связано с истощением системы генерации супероксида и означает снижение бактерицидной функции нейтрофилов при воздействии данных наночастиц. Поскольку продукция активных форм кислорода является формой неспецифической иммунной защиты, возможно, что это приводит к снижению уровня неспецифической защиты и, как следствие, к нарушению иммунного статуса. Также нами было установлено, что НЧС-ПВП *in vitro* не вызывали продукцию провоспалительных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) спленоцитами мышей, что свидетельствует об отсутствии индуцирующего провоспалительный ответ действия данных наночастиц.

Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЫШЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПУТИ ВВЕДЕНИЯ

В последние годы наночастицы серебра стали широко применяться в медицине в составе перевязочных и стоматологических материалов, покрытий для медицинского оборудования, а также медицинской одежды [132]. Углеродные нанотрубки используются в качестве носителей лекарственных веществ, биосенсоров в терапевтической диагностике, кроме того их применяют в генной и регенерационной терапии [80]. Использование наночастиц в составе лекарственных и диагностических препаратов предполагает многократное их применение. Широкое использование наночастиц в различных сферах жизнедеятельности человека требует более тщательного и комплексного изучения их возможных токсичных эффектов [197].

Эксперименты на животных моделях *in vivo* наиболее приближены к естественному процессу и лучше моделируют воздействие наночастиц на макроорганизм. В многоклеточном организме существует сложное взаимодействие различных систем: нервной, эндокринной, кровеносной, иммунной. Изменения в одной системе обязательно отражаются на других системах, возникают компенсаторные реакции, что может проявиться только со временем. Поэтому при оценке безопасности нанопрепаратов используют длительные эксперименты с учетом способа их введения в организм в качестве лекарства или диагностического компонента.

В рамках настоящей диссертационной работы мы провели исследование многократного ингаляционного, подкожного и внутрижелудочного воздействия наночастиц серебра и углеродных нанотрубок на иммунную систему мышей в течение 28 дней.

5.1. Изучение воздействия наночастиц серебра на иммунную систему мышей после многократного введения ингаляционным, подкожным или внутрижелудочным способом

Для изучения многократного воздействия НЧС-ПВП экспериментальным животным ежедневно вводили данные наночастицы ингаляционным, подкожным и внутрижелудочным способами в течение 28 дней. В качестве контроля использовали интактных мышей и мышей, которым вводили полимер поливинилпирролидон (ПВП) аналогичными способами.

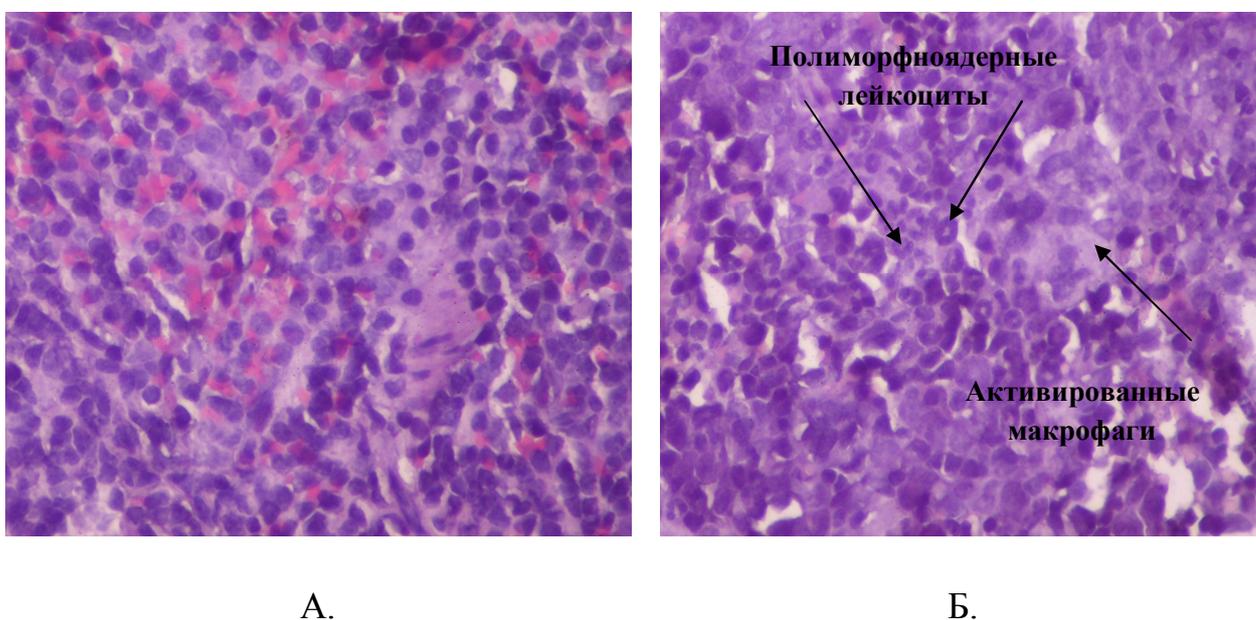
5.1.1. Гистологическое исследование органов мышей после многократного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном

Любое комплексное изучение препарата начинается с патоморфологического исследования. Окраска препаратов гематоксилином и эозином является самой распространенной и наиболее информативной в современной гистологии. Патоморфологическое исследование позволяет обнаружить изменения гистологической структуры органов и выявить в них возможные типовые патологические процессы (воспаление, некроз, опухоль), вызванные непосредственным воздействием наночастиц на клетки, либо опосредованным, например агломератами наночастиц, которые могут образовываться при изменении их коллоидной устойчивости при попадании в кровеносное русло и вызывать ишемию вследствие эмболии сосудов [9].

На первом этапе оценки многократного воздействия наночастиц серебра на организм экспериментальных животных нами было проведено гистологическое (патоморфологическое) исследование органов мышей линии BALB/c после ингаляционного, подкожного и внутрижелудочного введения НЧС-ПВП.

Животные всех экспериментальных групп выжили после окончания эксперимента. При введении контрольным животным ПВП всеми изученными способами патоморфологических изменений органов обнаружено не было. Гистологи-

ческое исследование легких, печени, почек, селезенки, паховых лимфатических узлов мышей линии BALB/c после ингаляционного и внутривенного введения НЧС-ПВП в течение 28 дней не показало наличия в них патологических изменений. Подкожное введение данного препарата приводило к изменению состава иммунокомпетентных клеток в селезенке, печени и паховых лимфатических узлах. В селезенке всех подопытных животных данной группы выявили гиперплазию красной пульпы, увеличение количества активированных макрофагов, интенсивную лимфоцитарную инфильтрацию, что является показателем активации иммунокомпетентных клеток организма животного. Также были выявлены многочисленные гнездовые скопления полиморфноядерных лейкоцитов (рисунок 8).



А – Преобладание лимфоцитов. Б – Обширное скопление полиморфноядерных лейкоцитов на фоне активированных макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 40$

Рисунок 8 – Красная пульпа селезенки мыши после подкожного введения физиологического раствора (А) и после подкожного введения НЧС-ПВП (Б)

В белой пульпе селезенки отклонений от нормы обнаружено не было. В печени наблюдались небольшие очаговые скопления Купферовых клеток. В пахово-

вых лимфатических узлах были выявлены расширенные синусы, в просвете которых наряду с лимфоцитами наблюдалось некоторое количество полиморфноядерных лейкоцитов. В легких и почках экспериментальных животных после подкожного введения наночастиц серебра патологических изменений обнаружено не было.

5.1.2. Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа, после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном

Концентрация белка в жидкости бронхо-легочного лаважа отражает альвеолярно-капиллярную проницаемость и/или альвеолит [131]. Поэтому следующим этапом было определение количества общего белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей, ингаляционно обработанных НЧС-ПВП, т.к. повышение данного показателя является одним из признаков легочного воспаления. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Содержание белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей линии BALB/c

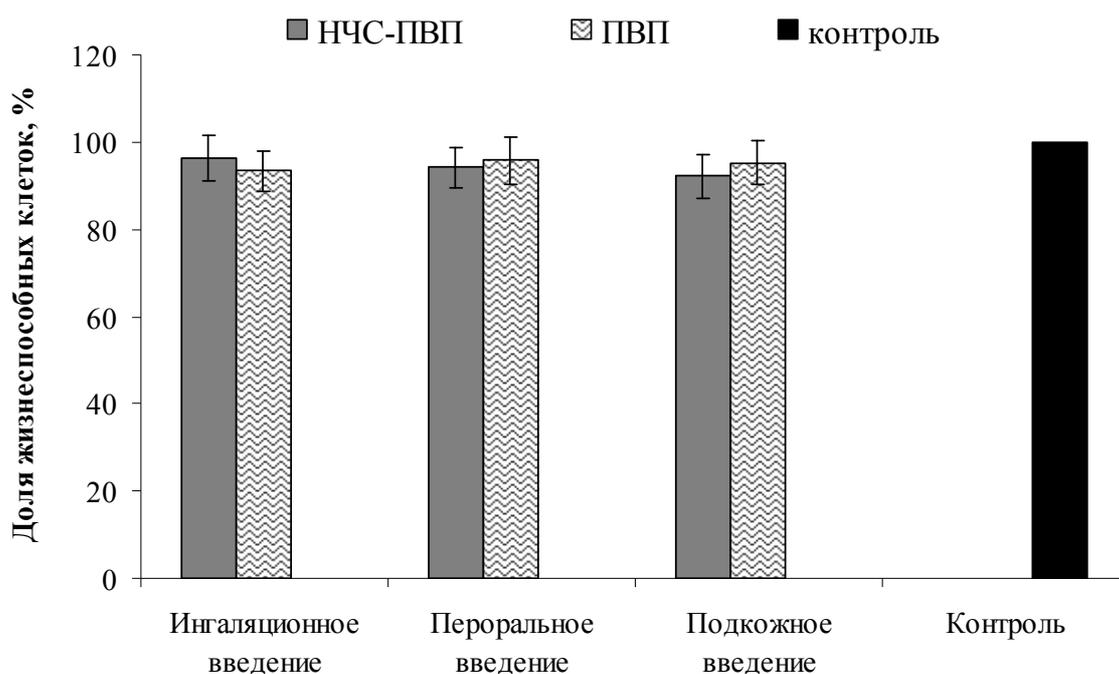
Способ введения НЧС-ПВП	Количество белка, мг/л
Ингаляционный	760,2±106,4
Контроль	660,4±94,8

Как видно из результатов, представленных в таблице 7, ингаляционное введение НЧС-ПВП не вызывало достоверного увеличения количества белка в просвете бронхо-легочной системы, а следовательно и не вызывало воспаления (таблица 7). ПВП также не вызывал увеличения содержания белка в жидкости бронхо-легочного лаважа.

5.1.3. Изучение цитотоксического воздействия наночастиц серебра на спленоциты мышей после введения их различными способами

В рамках диссертационной работы было изучено воздействие НЧС-ПВП на жизнеспособность спленоцитов в зависимости от способа введения в МТТ-тесте [129].

Оценка цитотоксического воздействия НЧС-ПВП на спленоциты мышей в МТТ-тесте показала, что жизнеспособность изучаемых клеток, полученных от животных всех экспериментальных групп, достоверно не отличалась и составляла в среднем $(94,26 \pm 4,47)$ % (рисунок 9).



Контроль – группа интактных мышей линии Balb/C.

Рисунок 9 – Жизнеспособность спленоцитов мышей линии Balb/C после введения НЧС-ПВП и ПВП различными способами

Введение ПВП всеми изученными способами также не влияло на жизнеспособность спленоцитов. Таким образом, можно сделать заключение, что НЧС-ПВП

не оказывали цитотоксического воздействия на спленоциты мышей при различных способах введения.

5.1.4. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей

После изучения воздействия НЧС-ПВП на жизнеспособность спленоцитов экспериментальных мышей при ингаляционном, пероральном и подкожном введениях, нами было изучено воздействие данных наночастиц при тех же способах введения на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей с помощью проточной цитофлюориметрии. Данный метод позволяет быстро, точно и качественно оценить влияние наночастиц на субпопуляционный состав лимфоцитов.

Цитометрическое определение процентного содержания субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей после введения НЧС-ПВП изучаемыми способами представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей, %

Способ введения НЧС-ПВП	Содержание лимфоцитов в селезенке мышей линии BALB/c, %			
	Т-лимфоциты	Т-хелперы	Цитотоксические лимфоциты	В-лимфоциты
Ингаляционный	31,99±3,7	20,04±2,5	9,33 ± 1,2	40,06±2,6
Подкожный	24,22±1,4	12,97±2,1	7,20±0,6	33,84±2,4
Внутрижелудочный	32,24±3,2	19,38±1,6	8,57±1,4	44,32±1,8
Контроль	30,56±2,8	18,56±1,2	9,77±0,8	50,26±1,6

Оценка субпопуляций лимфоцитов при ингаляционном и внутрижелудочном введении НЧС-ПВП показала отсутствие изменений относительного количества как Т-, так и В-лимфоцитов в отличие от подкожного введения НЧС-ПВП, при котором отмечали снижение относительного количества В-лимфоцитов в селезенке животных до (33,84±2,4) % по сравнению с контролем ((50,26±1,6) %) и

наблюдали тенденцию к снижению содержания Т-лимфоцитов (таблица 8). Воздействия ПВП на субпопуляционный состав лимфоцитов обнаружено не было.

5.1.5. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию провоспалительных цитокинов у экспериментальных мышей

Следующим этапом было изучение воздействия НЧС-ПВП на продукцию цитокинов у экспериментальных мышей. Для этого мы определяли количество цитокинпродуцирующих лимфоцитов в селезенке и концентрацию провоспалительных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) в сыворотке крови лабораторных мышей.

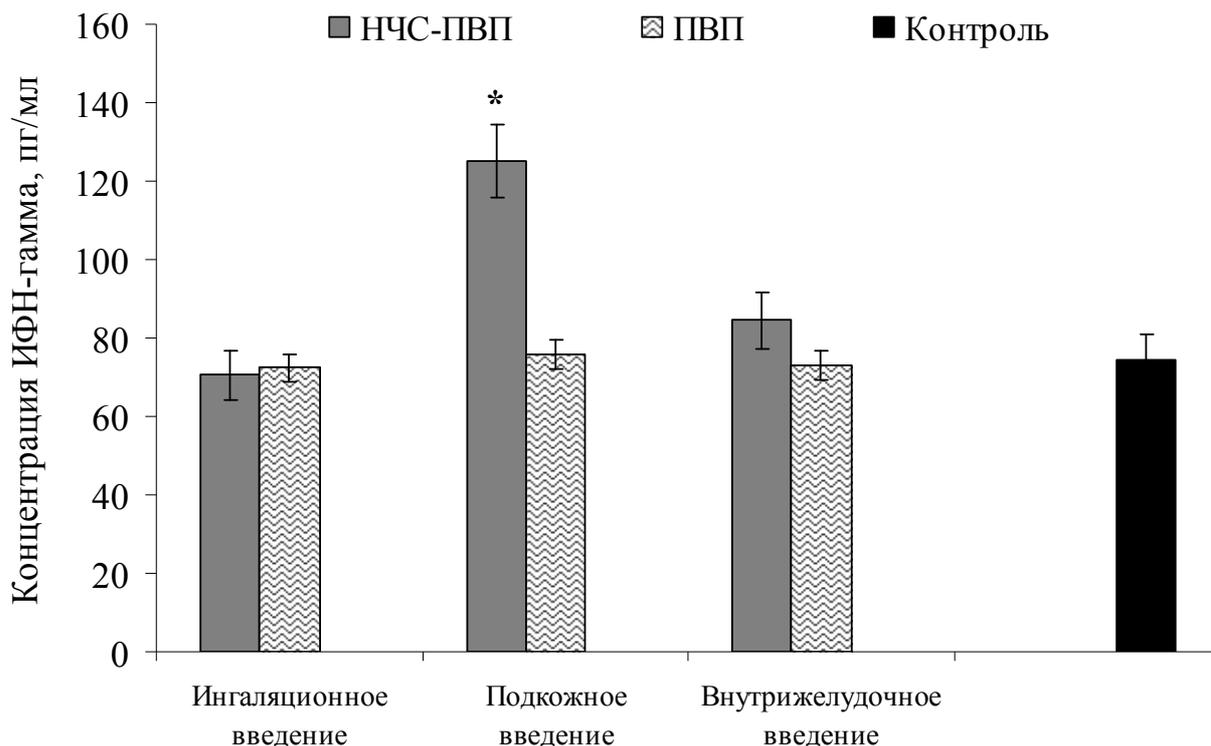
При оценке воздействия НЧС-ПВП на внутриклеточную продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов было установлено, что при подкожном способе введения данных наночастиц экспериментальным животным содержание ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке мышей возрастало в 3,6 раза по сравнению с контролем (таблица 9). Ингаляционное и внутрижелудочное введения НЧС-ПВП не влияли на количество ИФН- γ - и ФНО- α -продуцирующих Т-клеток в селезенке подопытных животных (таблица 9).

Таблица 9 – Содержание количества цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке мышей, %

Способ введения НЧС-ПВП	ИФН- γ -продуцирующие Т-лимфоциты	ФНО- α -продуцирующие Т-лимфоциты
Ингаляционный	5,81 \pm 1,7	2,69 \pm 0,9
Подкожный	*30,63 \pm 6,4	8,27 \pm 3,8
Внутрижелудочный	11,05 \pm 3,2	6,86 \pm 2,5
Контроль	8,38 \pm 4,8	3,69 \pm 1,2
Примечание – * – статистически значимое различие по сравнению с контролем при P<0,05.		

В проведенных экспериментах также было изучено воздействие НЧС-ПВП на содержание провоспалительных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) в сыворотке

крови подопытных животных. Содержание ФНО- α в сыворотке крови всех опытных групп мышей не изменялось относительно контроля. Количество ИФН- γ , содержащегося в сыворотке крови, увеличивалось при подкожном способе введения НЧС-ПВП до $(125 \pm 9,2)$ пг/мл относительно контрольной группы животных, у которых его значение составляло $(74,5 \pm 6,4)$ пг/мл (рисунок 10). Введение ПВП не влияло на внутриклеточное и сывороточное содержание ИФН- γ и ФНО- α .



Контроль – группа интактных мышей линии Balb/C.

* – статистически значимое различие по сравнению с контролем при $P < 0,05$.

Рисунок 10 – Содержание ИФН- γ в сыворотке крови мышей линии Balb/C после введения НЧС-ПВП и ПВП различными способами

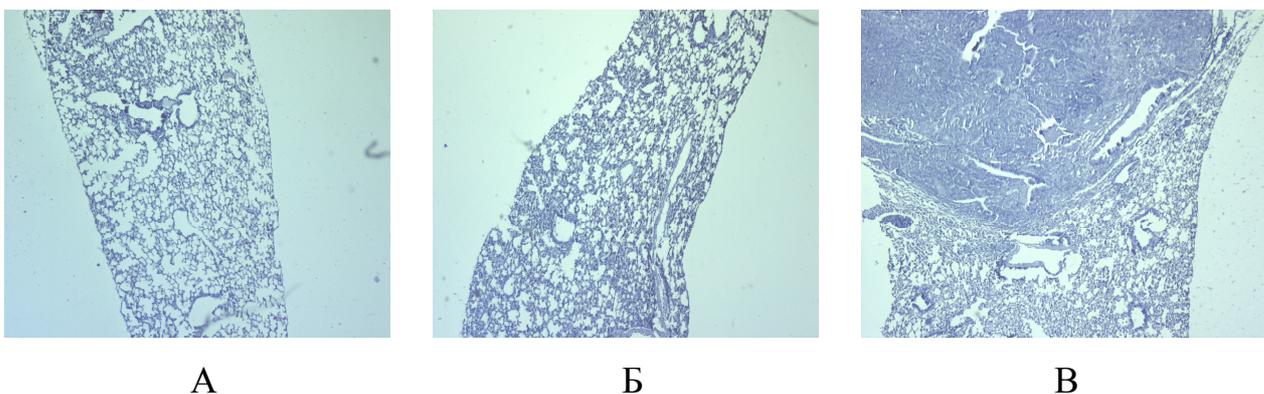
На основании полученных результатов можно сделать заключение, что подкожное введение НЧС-ПВП увеличивало продукцию провоспалительного цитокина гамма-интерферона.

5.2. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на иммунную систему мышей после многократного введения ингаляционным, подкожным или внутрижелудочным способом

Для изучения многократного воздействия УНТ экспериментальным животным ежедневно вводили данные наночастицы ингаляционным, подкожным и внутрижелудочным способами в течение 28 дней. В качестве контроля использовали интактных мышей.

5.2.1. Гистологическое исследование органов мышей после многократного воздействия углеродных нанотрубок

В результате гистологического исследования органов экспериментальных мышей, подвергшихся многократному ингаляционному воздействию нанотрубок, было обнаружено утолщение межальвеолярных перегородок в легких у 9 из 15 экспериментальных мышей. У четырех мышей были обнаружены обширные гранулемы из эпителиоидных клеток. На рисунке 11 представлены гистологические срезы лёгких исследованных мышей.



А – Легочная ткань без видимых изменений. Б – Диффузное утолщение межальвеолярных перегородок. В – Гранулема лёгочной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение объектива $\times 4$

Рисунок 11 – Легочная ткань мыши после ингаляционного введения физиологического раствора (А) и после ингаляционного введения углеродных нанотрубок (Б, В)

Патоморфологическое исследование органов иммунной системы не выявило гиперплазии или редукции лимфоидной ткани. В тимусе сохранялось четкое различие между широкой многоклеточной корой и мозговым веществом. В селезенке большую площадь занимала белая пульпа, клеточный состав и плотность инфильтрации красной пульпы так же не изменялись по сравнению с контролем. Лимфатические узлы были плотно инфильтрованы лимфоцитами.

Изменений в морфологии органов желудочно-кишечного тракта не было обнаружено. Слизистая оболочка языка, желудка, тонкого и толстого кишечника не имели повреждений и воспалительно-клеточной инфильтрации. Активность лимфоидных фолликулов кишечника не отличалась от контроля. В паренхиме и строме печени не было обнаружено патологических изменений. Патоморфологическое исследование нервной ткани и кровеносных сосудов головного мозга не выявило отклонений от нормы. Гистологическое исследование сердца не показало наличия патологических морфологических изменений.

Гистологическое исследование органов мышей показало, что нанотрубки при ингаляционном введении не проявляют стимулирующего или угнетающего действия на иммунную систему. Изменения патологического характера ограничены местом введения, легкими, и проявляются преимущественно диффузным утолщением межальвеолярных перегородок.

5.2.2. Определение количества белка, содержащегося в жидкости bronхо-легочного лаважа

Следующим этапом было определение количества общего белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей, ингаляционно обработанных углеродными нанотрубками, т.к. повышение данного показателя является одним из признаков легочного воспаления. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Содержание белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей линии BALB/c

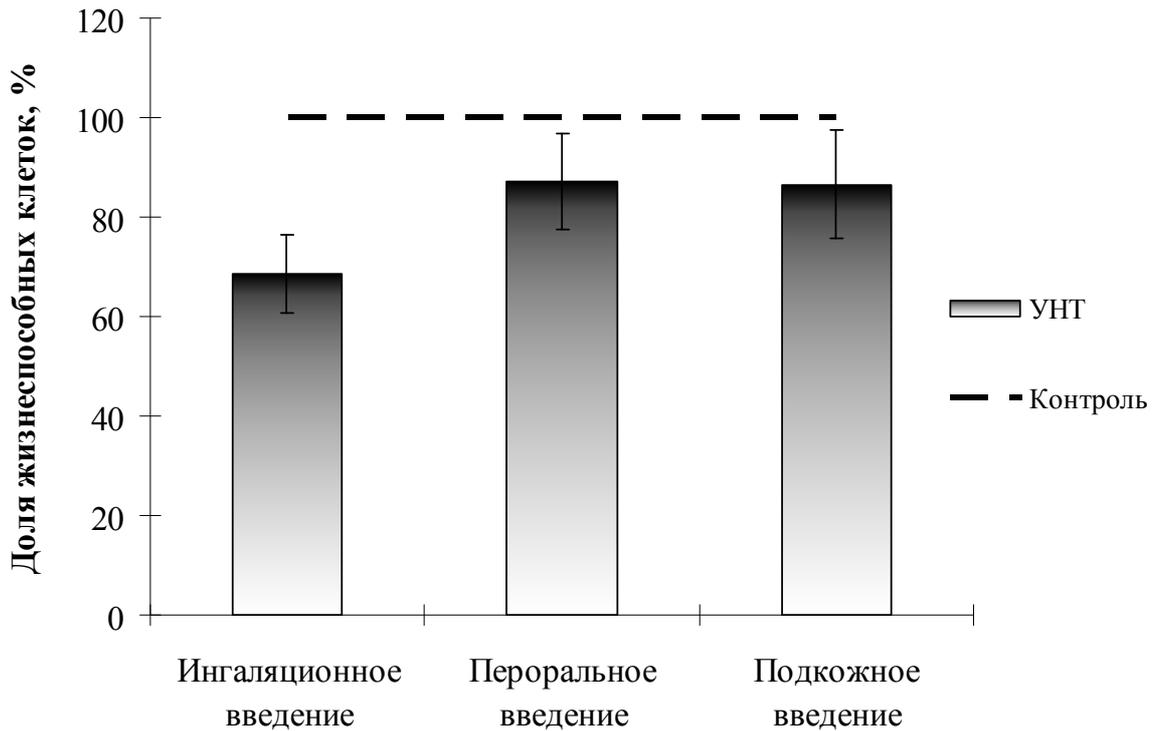
Способ введения УНТ	Количество белка, мг/л
Ингаляционный	*1380,2±151,6
Контроль	660,4±94,8
Примечание – * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем (P<0,001).	

Как видно из полученных результатов ингаляционное воздействие углеродных нанотрубок вызывало увеличение количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа, что свидетельствует о воспалительном процессе в легких.

5.2.3. Изучение цитотоксического воздействия углеродных нанотрубок на спленоциты мышей после введения их различными способами

Кроме гистологического исследования и выявления потенциально токсичных путей введения углеродных нанотрубок, нами было изучено воздействие данных наночастиц на иммунокомпетентные клетки мышей в зависимости от пути их введения в организм.

Воздействие нанотрубок на жизнеспособность спленоцитов в зависимости от способа введения изучали в МТТ-тесте [129]. На рисунке 12 представлены результаты исследования воздействия углеродных нанотрубок на жизнеспособность спленоцитов мышей в зависимости от способа введения наночастиц в МТТ-тесте.



Контроль – группа интактных мышей линии Balb/C.

Рисунок 12 – Жизнеспособность спленоцитов мышей линии Balb/C после введения УНТ различными способами

Как видно из рисунка углеродные нанотрубки оказывали цитотоксическое действие на жизнеспособность спленоцитов при ингаляционном введении экспериментальным мышам, снижая на 30% количество жизнеспособных клеток (рисунок 12).

Таким образом, можно сделать заключение, что углеродные нанотрубки обладали цитотоксическим действием при ингаляционном введении в организм мышей.

5.2.4. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки мышей в зависимости от пути введения в организм

Цитометрический анализ воздействия углеродных нанотрубок на субпопуляционный состав лимфоцитов показал, что в селезенке мышей, обработанных углеродными нанотрубками ингаляционно, наблюдалась тенденция к увеличению количества Т-лимфоцитов ($(40,66 \pm 2,3) \%$), в равной степени за счет Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. Лимфоцитарный индекс CD4/CD8 у этих животных не изменялся (таблица 11). У интактных мышей в селезенке Т-лимфоциты составляли $(35,24 \pm 1,97) \%$ от общего количества клеток, в том числе Т-хелперы $(23,27 \pm 1,34) \%$ и цитотоксические лимфоциты $(10,98 \pm 0,83) \%$. Индекс CD4/CD8 составил $(2,12 \pm 0,15)$. Содержание Т-лимфоцитов в селезенке у мышей, обработанных нанотрубками подкожно и перорально, достоверно не отличалось по сравнению с таковым у интактных животных и составляло $(31,15 \pm 1,78) \%$ и $(33,46 \pm 1,84) \%$ ($P > 0,05$), соответственно (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты фенотипирования спленоцитов мышей, обработанных углеродными нанотрубками подкожно, внутривенно и аэрозольно

Способ введения УНТ	Субпопуляционный состав спленоцитов, %			
	Т-лимфоциты	Т-хелперы	Цитотоксические лимфоциты	CD4/ CD8
Ингаляционный	$40,66 \pm 2,3$	$28,15 \pm 2,12$	$12,88 \pm 0,56$	$2,19 \pm 0,12$
Подкожный	$31,15 \pm 1,78$	$23,26 \pm 0,67$	$8,51 \pm 0,23$	$2,73 \pm 0,32$
Пероральный	$33,46 \pm 1,84$	$23,02 \pm 0,78$	$9,78 \pm 0,75$	$2,35 \pm 0,14$
Контроль	$35,24 \pm 1,97$	$23,27 \pm 1,34$	$10,98 \pm 0,83$	$2,12 \pm 0,15$

Лимфоцитарный индекс CD4/CD8 у мышей, подкожно обработанных УНТ, увеличивался до $(2,7 \pm 0,32)$ за счет снижения количества цитотоксических лимфоцитов. Значение лимфоцитарного индекса у мышей, обработанных нанотрубками перорально, не отличалось от такового у интактных животных (таблица 8).

5.2.5. Изучение воздействия углеродных нанотрубок на продукцию провоспалительных цитокинов у экспериментальных мышей

Следующим этапом диссертационной работы было определение количества ИФН- γ – и ФНО- α - продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке экспериментальных животных после ингаляционного, подкожного и внутрижелудочного введения УНТ. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Содержание количества цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке мышей, %

Способ введения УНТ	ИФН- γ -продуцирующие Т-лимфоциты	ФНО- α -продуцирующие Т-лимфоциты
Ингаляционный	8,54 \pm 1,34	2,71 \pm 1,13
Подкожный	9,31 \pm 1,67	4,18 \pm 1,56
Внутрижелудочный	7,12 \pm 1,54	3,98 \pm 1,15
Контроль	7,42 \pm 1,63	3,57 \pm 1,04

Оценка воздействия УНТ на внутриклеточную продукцию Т-лимфоцитами провоспалительных цитокинов не показала достоверного изменения относительного количества ИФН- γ - и ФНО- α -продуцирующих Т-клеток в селезенке подопытных животных (таблица 12).

5.3. Заключение по Главе 5

Многokратное ингаляционное и внутрижелудочное введение животным НЧС-ПВП в дозе 0,1 мг/кг не вызывало изменений исследованных показателей иммунной системы, что может быть связано как с особенностями биораспределения наночастиц серебра в организме, так и с величиной применяемой дозы. При ингаляционном и внутрижелудочном способах введения большая часть поступающих наночастиц проходит по дыхательному и желудочно-кишечному трактам, более всего воздействуя локально на органы этих систем и в меньшей степени распро-

страняясь по лимфатической и кровеносной системам [132]. Так, в работе Loeschner с соавт. (2011) [119] показано, что наибольшая концентрация наночастиц серебра ((14±4) нм), стабилизированных ПВП и вводимых внутривенно в течение 28 дней в дозе 9 мг/кг, была обнаружена в тонком кишечнике, желудке, почках и печени (и в меньшей степени определялась в крови). В работе по изучению ингаляционного воздействия наночастиц серебра размером 10 нм наибольшая концентрация серебра была зафиксирована в легких (через 40 ч воздействия концентрация серебра составила 31 мкг/г органа), в других органах она была ниже предела обнаружения [176]. Кроме того, важным фактором, обуславливающим токсичность наночастиц, является вводимая доза. В работе Шумаковой с соавт., (2011) [22] по изучению внутривенного воздействия наночастиц серебра препарата «Арговит» было показано, что доза 1 мг/кг вызывает увеличение кишечного всасывания овальбумина, снижение уровня глюкозы в крови, увеличение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови, однако доза 0,1 мг/кг не вызывала подобных изменений [22]. В проведенном нами исследовании ингаляционное введение НЧС-ПВП не приводило к достоверному увеличению количества белка в просвете бронхо-легочной системы, что свидетельствует об отсутствии воспаления в легких.

Данные наших экспериментов, полученные после подкожного многократного введения НЧС-ПВП мышам, показали снижение относительного количества В-лимфоцитов в селезенке животных по сравнению с контролем в 1,5 раза, а также тенденцию к снижению содержания Т-лимфоцитов в селезенках подопытных животных. Полученные результаты могут быть связаны с активной миграцией наночастиц серебра по лимфатической и кровеносной системам [200]. Частицы, имеющие диаметр менее 100 нм, попадают в лимфатические капилляры через промежутки между эндотелиальными лимфатическими клетками [77, 78, 84], воздействуя на иммунокомпетентные клетки лимфоидных органов. Так, в своей работе Tang с соавт. (2009) [183] показали, что наночастицы серебра в дозе 62,8 мг/кг при подкожном введении крысам способны перемещаться по кровяно-

му руслу и распределяться в таких органах как почки, печень, селезенка, мозг и легкие.

Проведенные нами гистологические исследования у мышей после подкожного введения наночастиц серебра выявили изменения в соотношении популяций иммунокомпетентных клеток в селезенке, печени и лимфатических узлах. Аналогичные результаты были описаны в работе Korani с соавт. (2011) [105], отмечавшие, что длительный кожный контакт с коллоидным наносеребром (в концентрации 100, 1000 и 10000 мг/л) приводил к развитию воспалительной реакции в печени и селезенке мышей и крыс и носил дозо-зависимый характер [105].

Иммунотоксичность наночастиц также проявляется в способности стимулировать продукцию цитокинов [206]. В работе Park с соавт. (2010) [141] было показано дозозависимое увеличение содержания противовоспалительных и провоспалительных цитокинов, в том числе ИФН- γ , в сыворотке крови мышей после перорального введения наночастиц серебра размером 42 нм в дозах: 0,25; 0,5 и 1 мг/кг в течение 28 дней [141]. Большое влияние на индукцию цитокинов оказывают физико-химические особенности поверхности наночастиц. В частности, в работе Nguyen с соавт. (2013) [135] показано, что покрытые ПВП наночастицы серебра (10, 50 и 75 нм), увеличивали продукцию ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-12 макрофагальной клеточной линией J774A.1, в то время как наночастицы серебра без ПВП снижали продукцию тех же цитокинов данными клетками [135]. В наших исследованиях при подкожном способе введения наночастиц серебра в дозе 0,1 мг/кг наблюдалось увеличение содержания ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и количества ИФН- γ в сыворотке крови подопытных животных.

На основании полученных результатов можно сделать заключение об отсутствии цитотоксического влияния НЧС-ПВП в дозе 0,1 мг/кг на популяции клеток в лимфоидных органах подопытных животных при ингаляционном и внутрижелудочном введении. Подкожное введение НЧС-ПВП приводило к изменениям субпопуляционного состава лимфоцитов, количества ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и концентрации ИФН- γ в сыворотке крови мышей.

Изучение воздействия углеродных нанотрубок на иммунную систему мышей в зависимости от пути введения показало, что при ингаляционном введении нанотрубок изменения патологического характера ограничены местом введения, легкими, и проявляются преимущественно диффузным утолщением межальвеолярных перегородок, а также образованием гранул, при этом стимулирующего или угнетающего действия на иммунную систему обнаружено не было. Было установлено, что УНТ проявляют цитотоксический эффект, выраженность которого зависит от пути поступления в организм животного. Выраженное снижение жизнеспособности спленоцитов отмечено у животных, обработанных УНТ ингаляционно. Тенденция к увеличению процентного содержания Т-лимфоцитов в селезенке мышей после ингаляционного воздействия УНТ вероятно связано с массовой гибелью других субпопуляций спленоцитов, что было зарегистрировано в МТТ-тесте. Изменения относительного количества ИФН- γ - и ФНО- α -продуцирующих Т-лимфоцитов у мышей линии BALB/c после воздействия УНТ обнаружено не было. Однако наблюдалось достоверное увеличение количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа у мышей после ингаляционного воздействия углеродных нанотрубок, что свидетельствует о воспалительном процессе в легких. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что при введении углеродных нанотрубок экспериментальным животным иммунологической перестройки организма не наблюдается. Однако длительное ингаляционное воздействие УНТ вызывает патологическое изменение структуры легочной ткани (гранулемы и диффузные утолщения межальвеолярных перегородок) и воспалительные реакции, что ограничивает использование данных наночастиц в составе аэрозолей.

Глава 6. ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОКРЫТЫХ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ, НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

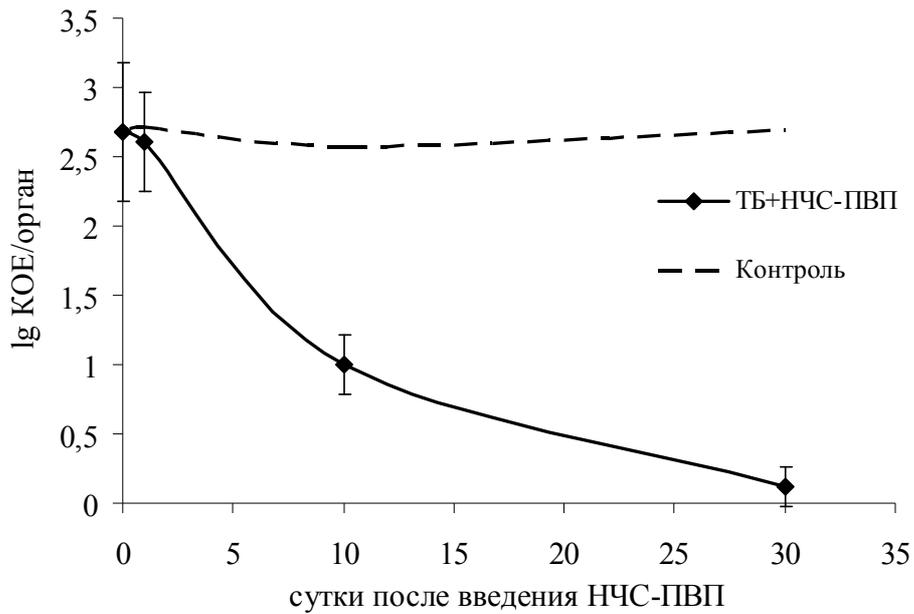
6.1. Воздействие наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на обсемененность легких и селезенок бактериями *M. tuberculosis* мышей линии C57BL/6

Мы изучили антибактериальное действие НЧС-ПВП на модели хронически больных туберкулезом мышей линии C57BL/6.

Мышей линии C57BL/6, зараженных внутрибрюшинно штаммом *M. tuberculosis* H37Rv в дозе $5,3 \times 10^4$, однократно ингаляционно обрабатывали препаратом наночастиц серебра в аэрозольной установке СО 099С А4224 (GLAS-COL APPARATUS, США) в течение 20 мин из расчета 0,1 мг серебра на 1 кг массы тела. После чего проводили микробиологические высевы из легких и селезенок экспериментальных мышей на 1, 10 и 30 сут после ингаляционного введения наночастиц серебра.

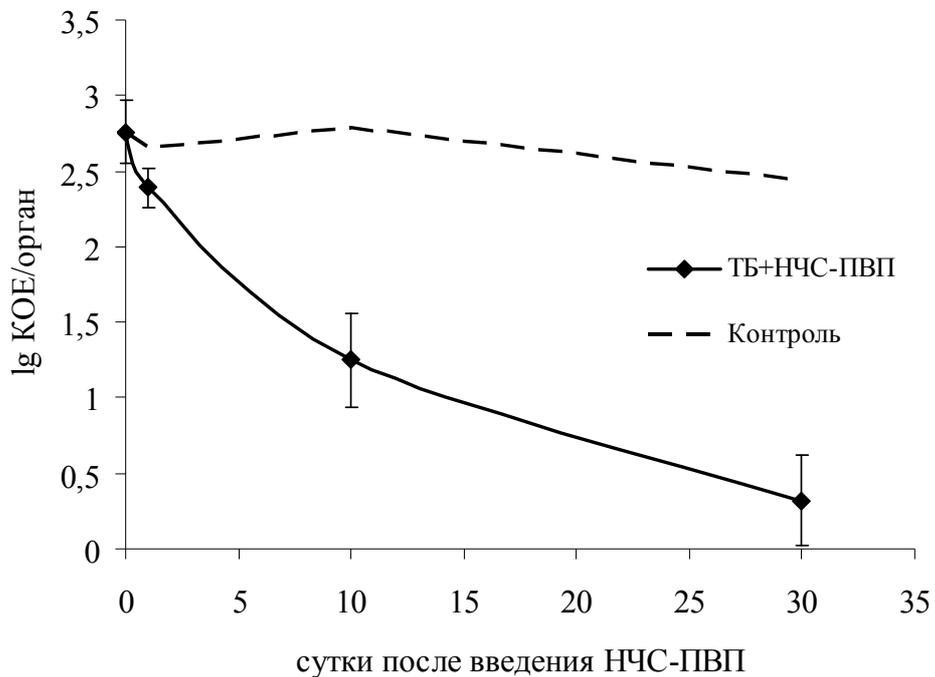
Микробиологические высевы показали снижение обсемененности легких *M. tuberculosis*: до воздействия НЧС-ПВП количество микобактерий в легких составляло $(4,8 \times 10^2 \pm 0,5)$ КОЕ/орган, после воздействия – и легких высевались единичные колонии, либо *M. tuberculosis* полностью отсутствовали (рисунок 13).

Также наблюдалось снижение обсемененности селезенок *M. tuberculosis* у экспериментальных животных (рисунок 14). До введения НЧС-ПВП количество микобактерий в селезенках составляло $(6,13 \times 10^2 \pm 2,57)$ КОЕ/орган. После введения НЧС-ПВП наблюдалось достоверное снижение обсемененности селезенок *M. tuberculosis*: через день количество микобактерий в селезенках снизилось до $(2,5 \times 10^2 \pm 0,7)$ КОЕ/орган ($P < 0,05$), а через 30 дней только у трех мышей из 10 высевались единичные колонии (рисунок 14).



Контроль – группа больных ТБ мышей без введения НЧС-ПВП.

Рисунок 13 – Динамика снижения обсемененности легких *M. tuberculosis* у мышей, больных хроническим ТБ, после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП



Контроль – группа больных ТБ мышей без введения НЧС-ПВП.

Рисунок 14 – Динамика снижения обсемененности селезенок *M. tuberculosis* у мышей, больных хроническим ТБ, после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП

6.2. Оценка иммунологических показателей хронически больных туберкулезом мышей линии С57В1/6 после ингаляционного введения наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном

Нами было проведено исследование функциональной активности иммунокомпетентных клеток этих групп животных. Мы оценили соотношение 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 бронхолегочного лаважа и бактерицидный потенциал фагоцитов.

6.2.1. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов селезенки мышей

Цитометрическое определение процентного содержания субпопуляций лимфоцитов в селезенке после введения препарата наночастиц серебра хронически больным туберкулезом мышам линии С57В1/6 представлено в таблице 13.

Таблица 13 – Содержание субпопуляций лимфоцитов в селезенке мышей, %

	Процентное содержание лимфоцитов в селезенке мышей линии С57В1/6, %			
	Т-лимфоциты	Т-хелперы	Цитотоксические лимфоциты	В-лимфоциты
ТБ	41,89±2,25*	28,47±1,37*	4,13±0,18	27,14±1,38*
ТБ+НЧС-ПВП	37,23±1,85	24,31±1,23	5,54±0,27	34,02±1,72
Контроль	36,12±1,72	23,02±1,15	6,32±0,31	35,41±1,82

Примечание – * – статистически значимое различие по сравнению с контролем при $P < 0,05$. Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП.

Оценка субпопуляций лимфоцитов у мышей с хронической формой ТБ показала увеличение Т-лимфоцитов на 5,77 % (в том числе Т-хелперов на 5,45 %)

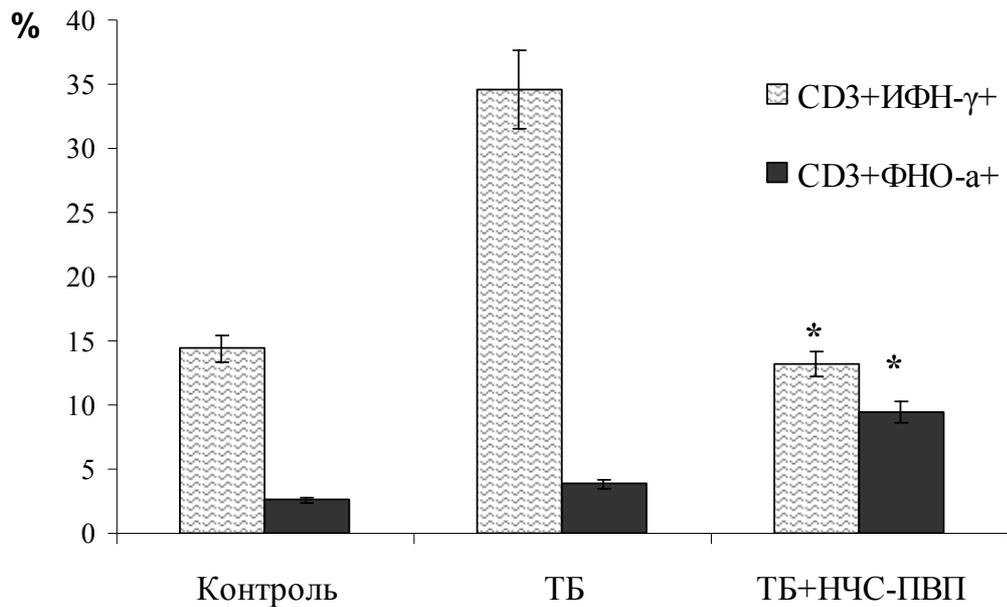
($P < 0,05$) и снижение В-лимфоцитов на 8,27 % ($P < 0,05$). После введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам относительное количество Т- и В-лимфоцитов достоверно не отличалось от значений данных показателей в контрольной группе животных (таблица 13).

6.2.2. Определение количества цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке мышей

Для оценки способности лимфоцитов продуцировать цитокины нами было проведено определение количества ИФН- γ - и ФНО- α – продуцирующих Т-лимфоцитов методом проточной цитофлюориметрии.

Результаты исследования показали, что в группе контрольных животных количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов составило ($14,42 \pm 1,02$) %, а ФНО- α -продуцирующих Т-лимфоцитов – ($2,57 \pm 0,21$) %. У мышей, больных туберкулезом, количество $CD3^+$ ИФН- γ^+ клеток было в два раза выше относительно контроля и составляло ($34,53 \pm 3,04$) % ($P < 0,001$), а количество $CD3^+$ ФНО- α^+ составляло $3,84 \pm 0,32$ % ($P < 0,05$). На 30 сут после введения больным ТБ мышам НЧС-ПВП количество Т-лимфоцитов, синтезирующих ИФН- γ , достоверно снизилось до ($13,15 \pm 0,98$) % ($P < 0,001$), что достоверно не отличается от значения данного показателя в группе контрольных животных. А количество ФНО- α -продуцирующих Т-лимфоцитов в данной группе увеличилось до ($9,49 \pm 0,81$) % ($P < 0,001$) (рисунок 15).

Основную роль в развитии протективного иммунитета при ТБ играют лимфоциты типа Th1 (Т-хелперы), имеющие фенотип $CD3^+$ $CD4^+$. Одной из основных характеристик данных лимфоцитов является способность к продукции цитокина гамма-ИФН, который вызывает активацию макрофагов и значительно увеличивает их антимикобактериальную активность. Дефицит лимфоцитов $CD3^+$ $CD4^+$ и /или недостаточность продукции этими клетками ИФН- γ значительно увеличивают восприимчивость к инфекции и приводят к крайне тяжелому течению ТБ [16, 91].

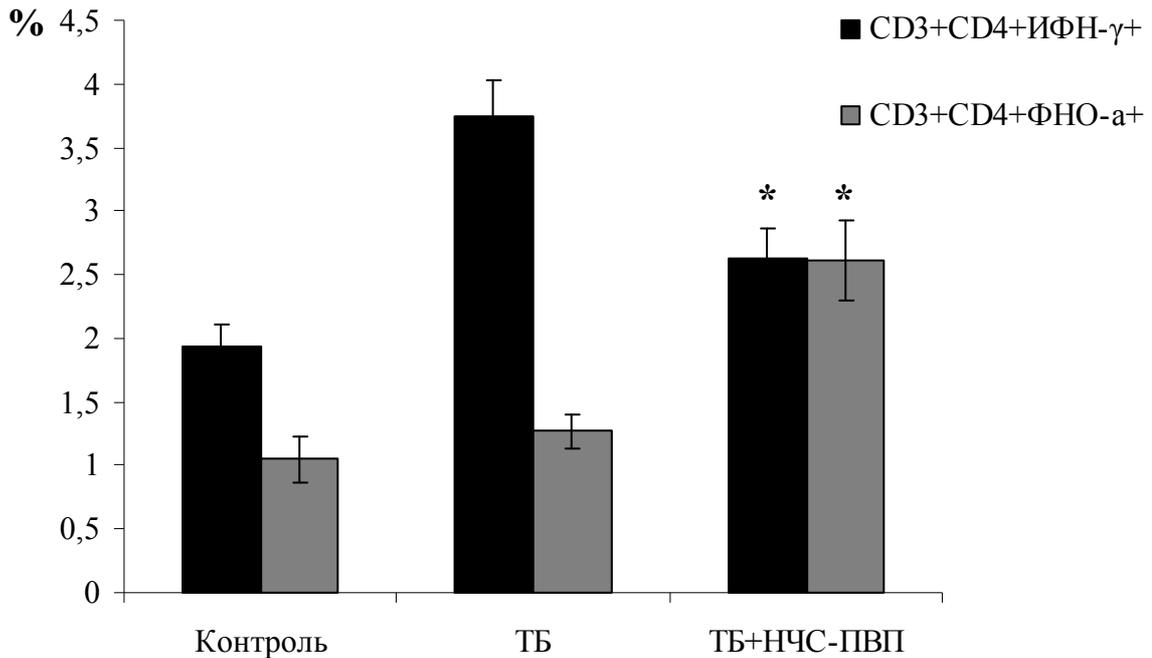


Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,001$).

Рисунок 15 – Процент цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов ($CD3^+$)

Поэтому следующим шагом нашей исследовательской работы была оценка количества ИФН-γ- и ИФН-α -продуцирующих Т-хелперов ($CD3^+ CD4^+$) в селезенке больных ТБ мышей до и после введения НЧС-ПВП. Полученные результаты представлены на рисунке 16.

Как можно видеть на рисунке 16, отражающем полученные нами данные, процент ИФН-γ-продуцирующих Т-хелперов в селезенке больных ТБ мышей составлял $3,75 \pm 0,28$ %, что в два раза превышало значение данного показателя в контрольной группе ($1,93 \pm 0,18$ %, $P < 0,05$). Через 30 сут после введения НЧС-ПВП процент данной популяции Т-хелперов снижался до ($2,63 \pm 0,23$) % ($P < 0,05$).



Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП.

* – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,05$).

Рисунок 16 – Процент цитокинпродуцирующих Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$)

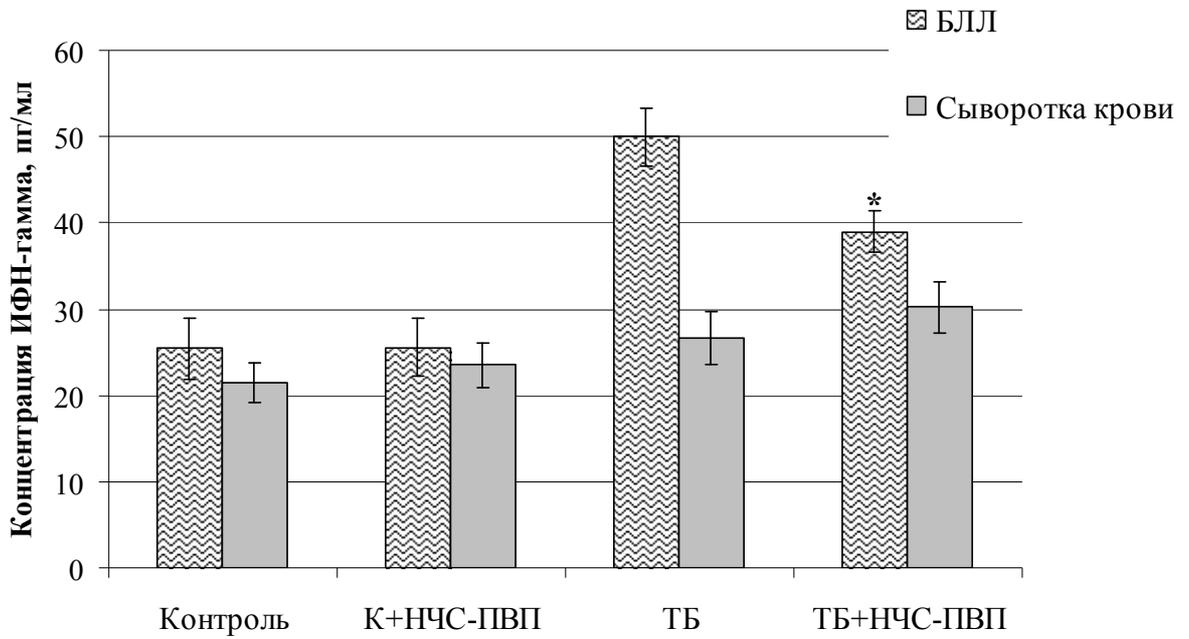
Относительное количество $IFN-\alpha$ -продуцирующих Т-хелперов в группах здоровых и больных ТБ мышей достоверно не отличалось друг от друга и составляло $(1,05 \pm 0,18)$ и $(1,27 \pm 0,13)$ % соответственно. В группе больных ТБ животных, подвергшихся воздействию НЧС-ПВП, наблюдалось увеличение $IFN-\alpha$ -продуцирующих Т-хелперов до $(2,61 \pm 0,31)$ % через 30 сут ($P < 0,05$) (рисунок 16).

6.2.3. Определение уровня цитокинов в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

В проведенных экспериментах было изучено воздействие НЧС-ПВП на содержание провоспалительных ($IFN-\gamma$ и $IFN-\alpha$) и противовоспалительного

(ИЛ-4) цитокинов в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа больных ТБ мышей.

Содержание ИФН- γ в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ экспериментальных мышей представлено на рисунке 17.



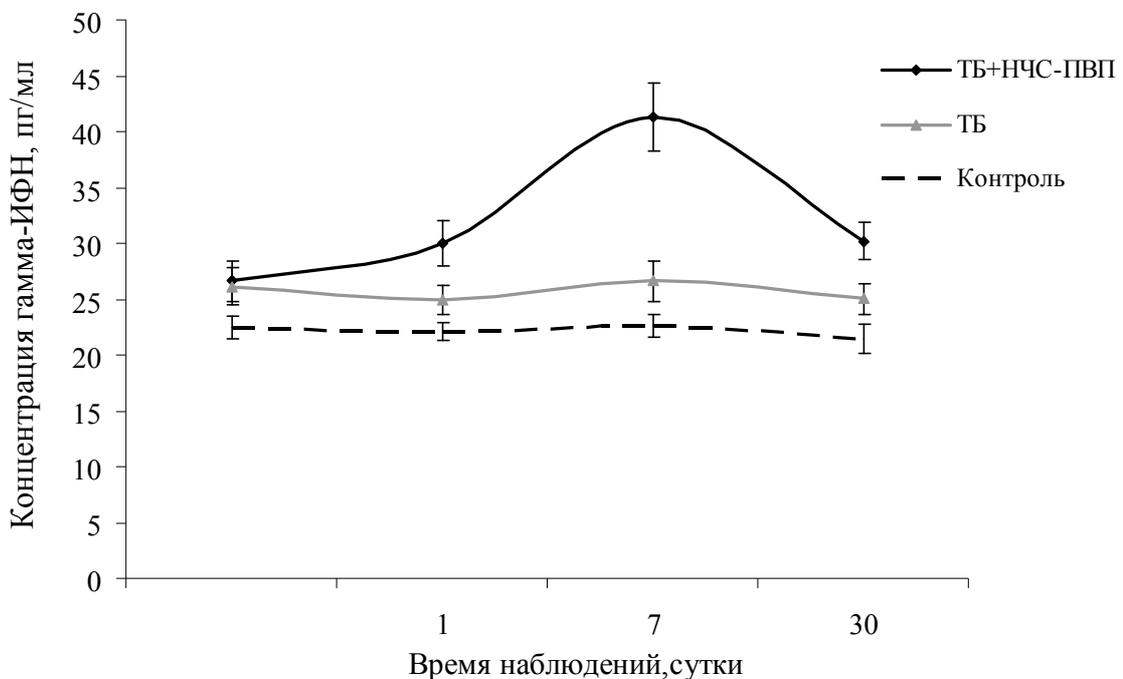
Контроль – группа здоровых мышей, К+НЧС-ПВП – группа здоровых мышей через месяц после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,05$).

Рисунок 17 – Содержание ИФН- γ в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

Из диаграммы видно, что у больных ТБ мышей наблюдался повышенный уровень гамма-интерферона в жидкости БЛЛ ($50,01 \pm 3,33$ пг/мл) по сравнению с контрольной группой животных ($(25,40 \pm 3,58)$, $P < 0,05$). На 30 сут после введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам содержание ИФН- γ в жидкости БЛЛ снижалось до $(39,00 \pm 2,35)$ пг/мл, $P < 0,05$ (рисунок 17). В экспериментах по изучению уровня ИФН- γ в сыворотке крови мышей не было получено достоверных отличий в со-

держании данного цитокина во всех испытуемых группах на 30 сут наблюдения (рисунок 17).

Однако при изучении динамики изменения содержания ИФН- γ в сыворотке крови больных ТБ мышей в течение месяца после введения НЧС-ПВП наблюдалось достоверное увеличение количества данного цитокина на 7 сут после воздействия. Содержание ИФН- γ в группе больных ТБ мышей составляло $(26,6 \pm 1,83)$ пг/мл, а на 7 сут после введения НЧС-ПВП – $(41,34 \pm 3,06)$, $P < 0,05$. К 30 сут уровень гамма-интерферона снижался до значения $(30,20 \pm 1,62)$ пг/мл, но оставался достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ (рисунок 18).

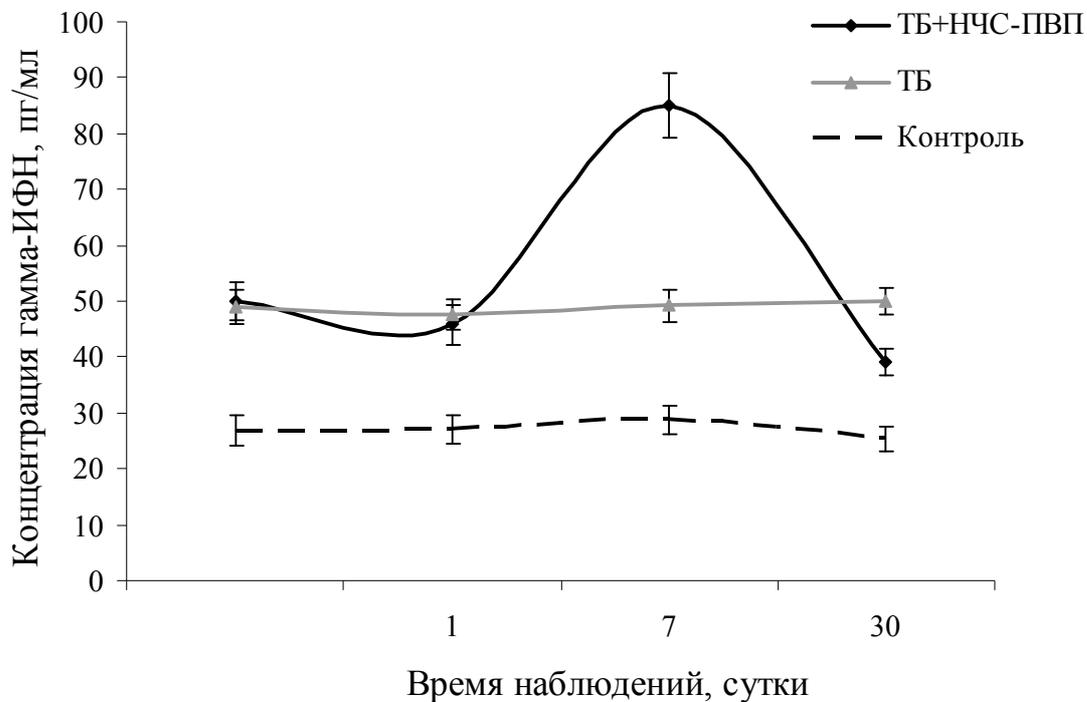


ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, Контроль – группа здоровых мышей.

Рисунок 18 – Динамика изменения содержания ИФН- γ в сыворотке крови мышей в течение месяца

В жидкости БЛЛ больных ТБ мышей на 7 сут после введения НЧС-ПВП также наблюдалось 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, $P < 0,05$). К 30 сут после введения

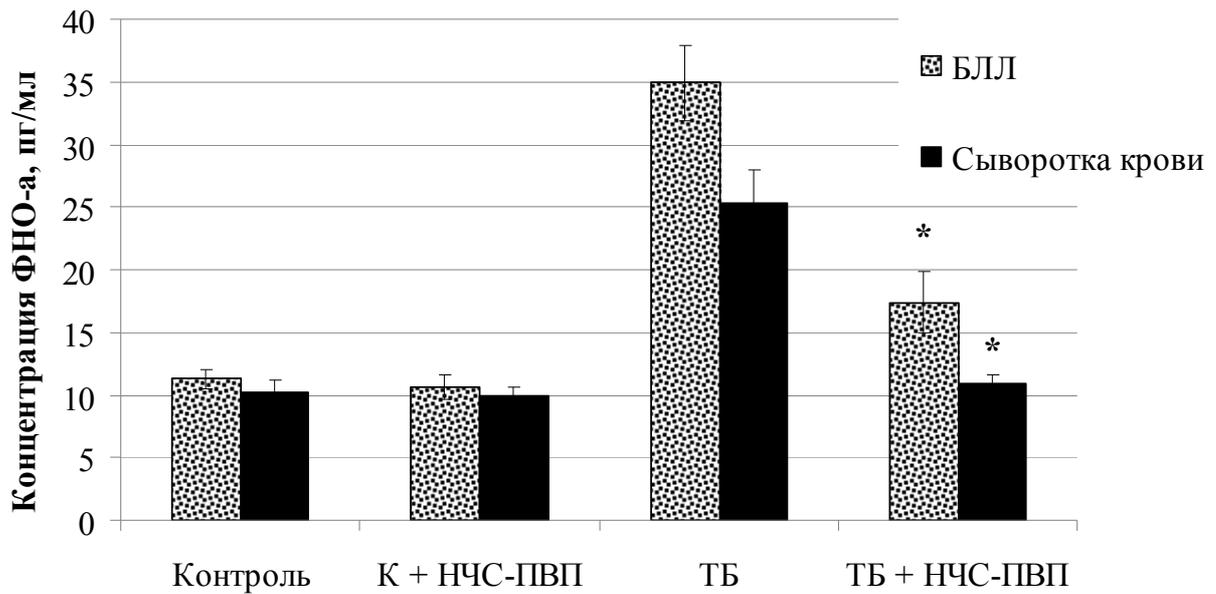
НЧС-ПВП содержание ИФН- γ составляло $(39,00 \pm 2,35)$ пг/мл, что достоверно ниже содержания данного цитокина в группе больных ТБ мышей ($P < 0,05$) (рисунок 19).



ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, Контроль – группа здоровых мышей.

Рисунок 19 – Динамика изменения содержания ИФН- γ в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей в течение месяца

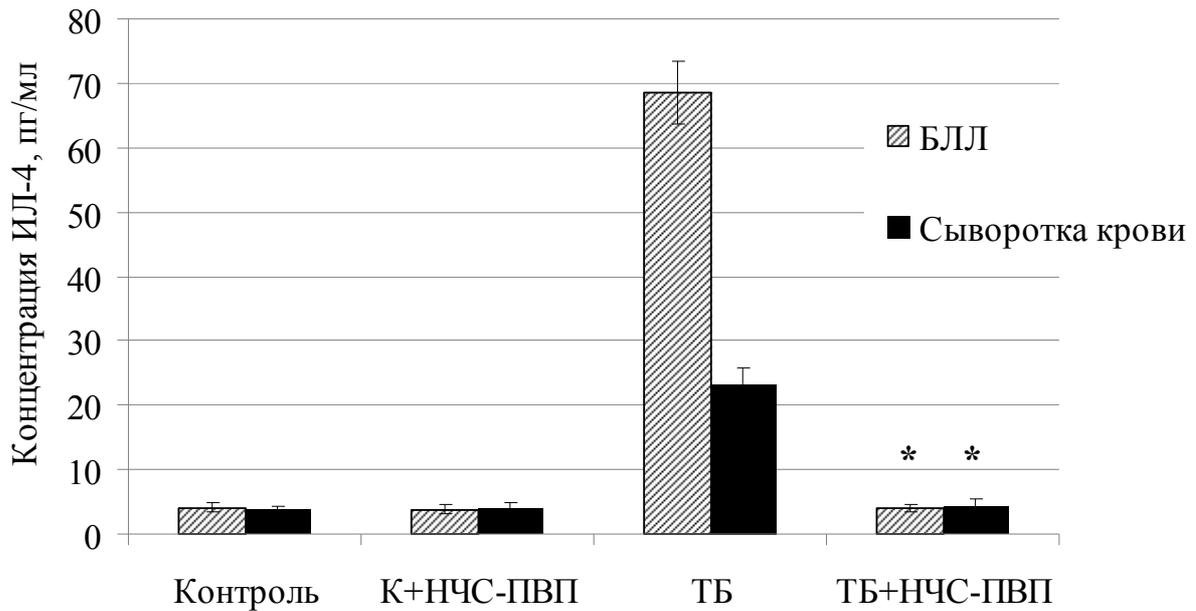
Содержание ФНО- α в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ экспериментальных мышей представлено на рисунке 20. У больных ТБ мышей наблюдался повышенный уровень данного цитокина в сыворотке крови ($25,37 \pm 2,61$ пг/мл) и в жидкости БЛЛ ($34,91 \pm 2,98$ пг/мл) по сравнению с контрольной группой ($(10,27 \pm 0,85)$ пг/мл и $(11,29 \pm 0,79)$, соответственно, $P < 0,05$). После введения НЧС-ПВП содержание ФНО- α в сыворотке крови больных ТБ мышей снижалось до $(10,89 \pm 0,78)$ пг/мл, а в жидкости БЛЛ – до $(17,40 \pm 2,41)$, $P < 0,001$ (рисунок 20).



Контроль – группа здоровых мышей, К+НЧС-ПВП – группа здоровых мышей через месяц после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,001$).

Рисунок 20 – Содержание ФНО- α в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

Содержание противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ экспериментальных мышей представлено на рисунке 21. Из диаграммы видно, что у больных ТБ мышей наблюдалось значительное увеличение содержания ИЛ-4 в сыворотке крови и в жидкости БЛЛ в 6 и 17 раз соответственно относительно значений данных показателей в контрольной группе ($(3,67 \pm 0,72)$ и $(4,12 \pm 0,64)$ пг/мл, $P < 0,001$). Через 30 сут после введения наночастиц серебра у мышей, больных ТБ, наблюдалось снижение уровня ИЛ-4 до $(4,23 \pm 1,08)$ пг/мл в сыворотке крови и до $(3,91 \pm 0,55)$ пг/мл в жидкости БЛЛ ($P < 0,001$), что достоверно не отличалось от содержания ИЛ-4 в исследованных биологических жидкостях животных контрольной группы (рисунок 21).



Контроль – группа здоровых мышей, К+НЧС-ПВП – группа здоровых мышей через месяц после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП. * – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,001$).

Рисунок 21 – Содержание ИЛ-4 в сыворотке крови и жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

6.2.4. Определение количества белка, содержащегося в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей

Концентрация белка в жидкости бронхо-легочного лаважа отражает альвеолярно-капиллярную проницаемость и/или альвеолит [131]. Поэтому следующим этапом было определение количества общего белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей, хронически больных туберкулезом, до и после ингаляционного воздействия НЧС-ПВП т.к. повышение данного показателя является одним из признаков легочного воспаления. Содержание количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа экспериментальных мышей представлено в таблице 14.

Таблица 14 – Содержание количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа мышей, мг/л

	Количество белка, мг/л
Контроль	926,7±76,3
Контроль+НЧС-ПВП	897,2±81,4
ТБ	3826,8±215,3*
ТБ+НЧС-ПВП	1908,5±105,7**

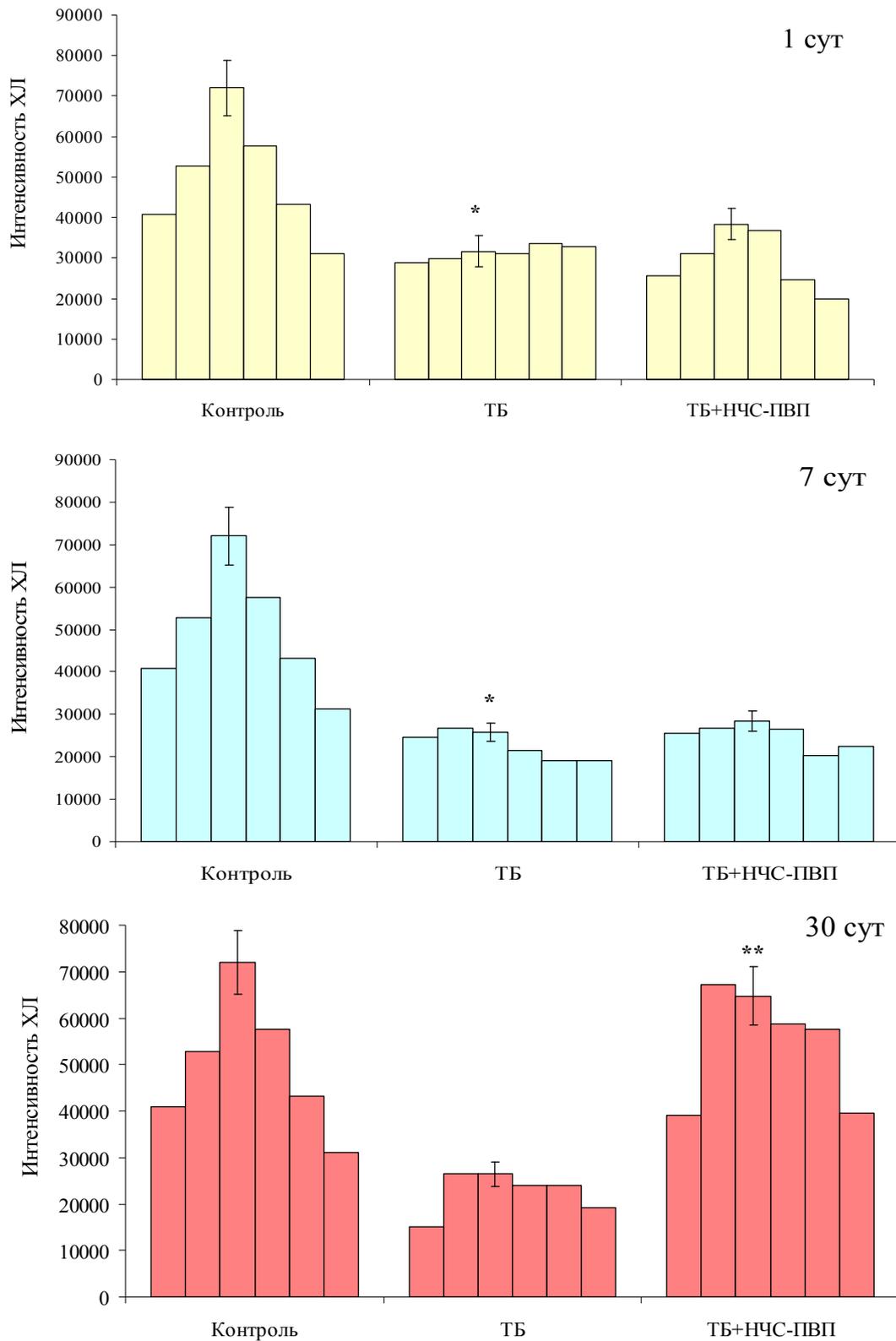
Примечание – * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P<0,001$); ** – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P<0,001$). Контроль – группа здоровых мышей, Контроль+НЧС-ПВП – группа здоровых мышей через месяц после введения НЧС-ПВП, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей через месяц после введения НЧС-ПВП.

Как видно из таблицы 14 у мышей, хронически больных ТБ, наблюдалось повышение содержания белка в жидкости бронхо-легочного лаважа до (3826,8±215,3) мг/л по сравнению с таковым показателем в контрольной группе животных (926,7±76,3) мг/л (увеличение в 4 раза). После воздействия НЧС-ПВП количество белка в жидкости бронхо-легочного лаважа снижалось в два раза до показателя (1908,5±105,7) мг/л, что отражает уменьшение воспаления в легких. У контрольных животных ингаляционное введение НЧС-ПВП не вызывало увеличения количества белка в жидкости бронхо-легочного лаважа.

6.2.5. Изучение воздействия наночастиц серебра, покрытых поливинилпирролидоном, на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами мышей, больных туберкулезом

Бактерицидная способность нейтрофилов играет ключевую роль в иммунопатогенезе туберкулеза. Бактерицидный потенциал данных клеток обуславливается в том числе через продукцию активных форм кислорода. Интересным представлялось изучение воздействия НЧС-ПВП на продукцию активных форм кисло-

рода нейтрофилами больных ТБ мышей. Оценку уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами проводили с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции. Значение интенсивности хемилюминесценции измерялось 6 раз, длительность одного измерения 10 мин. Концентрация люминола $5,6 \times 10^{-4}$ М. Интенсивность продукции АФК нейтрофилами больных ТБ мышей была снижена по сравнению со значениями данного показателя в группе контрольных животных ($P < 0,001$) (рисунок 22). Через 30 сут после введения НЧС-ПВП наблюдалось увеличение в 2,5 раза уровня продукции АФК нейтрофилами больных ТБ мышей ($P < 0,001$), что достоверно не отличалось от контрольных значений (рисунок 22). Полученные данные свидетельствуют об увеличении бактерицидной активности нейтрофилов больных ТБ мышей после воздействия НЧС-ПВП.



Контроль – группа здоровых мышей, ТБ – группа больных ТБ мышей, ТБ+НЧС-ПВП – группа больных ТБ мышей после введения НЧС-ПВП.
 * – результат статистически достоверен по сравнению с контролем ($P < 0,001$);
 ** – результат статистически достоверен по сравнению с группой мышей, больных ТБ ($P < 0,001$).

Рисунок 22 – Уровень продукции АФК нейтрофилами мышей

6.3. Заключение по Главе 6

Ингаляционное введение НЧС-ПВП мышам с хронической формой туберкулеза способствовало снижению количества высеваемых *M. tuberculosis* из легких и селезенки на 95 % по сравнению с животными без введения наночастиц серебра.

Субпопуляционный состав лимфоцитов в селезенке после введения НЧС-ПВП больным ТБ мышам не отличался от данных показателей в группе здоровых животных.

Процентное содержание Т-лимфоцитов (в том числе Т-хелперов), способных к продукции ИФН- γ , при течение хронического ТБ было значительно выше данного значения у здоровых животных. Однако после введения больным ТБ мышам НЧС-ПВП наблюдалось снижение относительного количества данных лимфоцитов. Полученные нами результаты о влиянии НЧС-ПВП на количество ИФН- γ -позитивных клеток согласуются с работами других авторов. В литературе имеются данные о том, что у больных туберкулезом количество Т-лимфоцитов, содержащих внутриклеточный ИФН- γ , повышено по сравнению со здоровыми лицами и носителями латентной инфекции. Лечение туберкулеза сопровождается снижением количества ИФН- γ -позитивных клеток. По мнению ряда авторов высокое содержание ИФН- γ -продуцирующих лимфоцитов у больных туберкулезом является следствием перманентной стимуляции Т-клеток антигенами микобактерий и увеличением пула антигенспецифических Т-лимфоцитов [8]. Таким образом, уменьшение относительного количества ИФН- γ -продуцирующих лимфоцитов в селезенке после введения НЧС-ПВП скорее всего вызвано уменьшением количества *M. tuberculosis*.

Такая же закономерность была нами отмечена и при измерении уровней ИФН- γ как в сыворотке крови, так и в жидкости бронхо-легочного лаважа. Сывороточное содержание данного цитокина резко увеличивалось через 7 сут после введения НЧС-ПВП, что по времени совпадало с уменьшением количества мико-

бактерий в легких и селезенке. Однако через 30 сут после воздействия наночастиц серебра количество гамма-интерферона в сыворотке крови снижалось, но оставалось достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ. Содержание данного цитокина в жидкости БЛЛ также резко увеличивалось через 7 сут после введения НЧС-ПВП, а к 30 сут снижалось. В исследовательских работах, изучающих данный вопрос, отмечается, что у больных активным туберкулезом уровень ИФН- γ в крови снижен по сравнению со здоровыми лицами, а лечение туберкулеза сопровождается повышением сывороточного уровня ИФН- γ . В то же время по некоторым наблюдениям у больных туберкулезом, особенно при благоприятном течении процесса, может отмечаться и высокий уровень ИФН- γ [8].

Ингаляционное введение НЧС-ПВП больным ТБ мышам приводило к увеличению относительного количества ФНО- α -продуцирующих Т-хелперов в селезенке. А количество ФНО- α , содержащегося в сыворотке крови и жидкости БЛЛ, наоборот уменьшалось, что указывает на снижение уровня воспалительных реакций организма [42, 171].

Для лучшего понимания воздействия НЧС-ПВП на течение хронического туберкулеза мы определили содержание противовоспалительного цитокина ИЛ-4 в сыворотке крови и жидкости БЛЛ экспериментальных животных. В результате проведенных исследований было установлено, что в изученных биологических жидкостях больных туберкулезом мышей наблюдался повышенный уровень ИЛ-4. После введения НЧС-ПВП уровень данного цитокина снижался до значений контрольных групп животных. Такая же закономерность наблюдается после противотуберкулезной лимфотропной химиоиммунотерапии [7].

Уменьшение количества белка в жидкости БЛЛ у хронически больных ТБ мышей после воздействия НЧС-ПВП также свидетельствует о снижении уровня воспаления в легких.

В нашей экспериментальной работе наблюдалось снижение уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами в группе больных ТБ мышей, что связано со способностью микобактерий снижать бактерицидный потенциал моно-

нуклеарных фагоцитов – основных продуцентов токсичных метаболитов кислорода. Через 30 сут после введения НЧС-ПВП данной группе животных наблюдалось увеличение уровня продукции АФК в 2,5 раза, что по времени совпадает со снижением микобактериальной нагрузки органов. В результате снижения обсеменности органов микобактериями снижается уровень воспаления в легких, а, следовательно, вновь продуцируемые поколения нейтрофилов, выходящие из костного мозга и насыщающие весь организм, а особенно очаги воспаления, являются более полноценными и компетентными фагоцитами, т.е. обладают большей способностью к продукции активных форм кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы нами были исследованы антибактериальные и иммунобиологические свойства наночастиц серебра и углеродных нанотрубок, а также выявлены особенности их действия на иммунную систему здоровых и инфицированных *M. tuberculosis* экспериментальных животных в зависимости от пути проникновения этих частиц в макроорганизм.

Анализ бактерицидной активности тестируемых наночастиц в экспериментах *in vitro* показал, что более выраженной бактерицидностью по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям обладают НЧС-ПВП.

На основании результатов, полученных при оценке цитотоксичности тестируемых наночастиц в экспериментах *in vitro*, было показано, что НЧС обладают более выраженными цитотоксическими свойствами по сравнению с НЧС-ПВП и УНТ. Даже в минимальной концентрации 0,05 мг/л эти наночастицы снижали митохондриальную активность макрофагов на 23 %. Углеродные нанотрубки не оказывали цитотоксического воздействия на мышечные макрофаги в низких концентрациях (0,05; 0,25 и 0,5 мг/л). Токсическое действие данных наночастиц наблюдалось при более высоких концентрациях (5-50 мг/л).

Наименьшей цитотоксичностью характеризовались НЧС-ПВП. При всех изученных нами концентрациях, кроме самой высокой (50 мг/мл) эти наночастицы не снижали активность митохондриальных дегидрогеназ макрофагов в течение 24 ч инкубации. Снижение активности митохондриальных дегидрогеназ макрофагов в присутствии НЧС-ПВП при самой высокой тестовой концентрации 50 мг/л снижалась через 24 ч, но уже к 48-72 ч инкубации не отличалась от показателей контрольных клеток, что свидетельствует об отсутствии ингибирующей активности препарата на ферментную систему клеток. НЧС-ПВП не индуцировали развитие окислительного стресса в клетках и не снижали бактерицидную способность нейтрофилов. Под воздействием НЧС-ПВП *in vitro* не наблюдалась продукция провоспалительных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) спленоцитами мышей.

В ходе проведенных нами исследований была установлена зависимость влияния наночастиц на функциональную активность иммунокомпетентных клеток и морфологическую структуру органов мышей от пути проникновения в организм животного.

УНТ при подкожном или пероральном введении мышам не оказывали цитотоксического действия на иммунокомпетентные клетки и не вызывали морфологических изменений в органах. При ингаляционном введении УНТ не оказывали выраженного действия на клетки иммунной системы. Однако данные гистологических исследований показали, что ингаляционное введение УНТ вызывает патоморфологические изменения в легких, проявляющиеся диффузным утолщением межальвеолярных перегородок и образованием гранулем.

Многократное ингаляционное и внутрижелудочное введение животным НЧС-ПВП не вызывало изменения исследованных показателей иммунной системы и морфологической структуры органов мышей. Подкожное введение НЧС-ПВП оказывало воздействие на субпопуляционный состав лимфоцитов, количество ИФН- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов в селезенке и содержание ИФН- γ в сыворотке крови мышей. Проведенные нами гистологические исследования у мышей после подкожного введения наночастиц серебра выявили изменения в соотношении популяций иммунокомпетентных клеток в селезенке, печени и лимфатических узлах, что совпадает с данными Koganі с соавт. (2011) [105].

На основании полученных результатов нами было показано, что НЧС-ПВП обладают высокой бактерицидной активностью и характеризуются отсутствием токсического действия для организма животных, что послужило основой для выбора данного препарата для дальнейших его исследований на мышинной модели хронического туберкулеза. Микробиологические исследования, проведенные после ингаляционного введения НЧС-ПВП, показали снижение обсемененности легких *M. tuberculosis* до единичных колоний, либо полное отсутствие *M. tuberculosis*. Кроме того, после введения НЧС-ПВП мышам, больным хроническим туберкулезом, процентное содержание Т-лимфоцитов, синтезирующих

ИФН- γ и ФНО- α , не отличалось от данных показателей в группе здоровых животных, что согласуется с работами других авторов [8].

В наших исследованиях мы выявили, что через 7 сут после ингаляционного введения мышам НЧС-ПВП содержание ИФН- γ в сыворотке крови увеличивалось, что по времени совпадает с резким уменьшением количества микобактерий в легких и селезенках. К 30 сут после введения НЧС-ПВП количество ИФН- γ в сыворотке крови снижалось, но оставалось достоверно выше показателей контрольной группы и группы мышей, больных ТБ.

Одним из признаков воспалительных процессов в легких является высокое содержание белка в жидкости бронхо-легочного лаважа. В наших экспериментах мы выявили увеличение белка в бронхо-легочном лаваже у мышей, больных хроническим туберкулезом, в четыре раза по сравнению с данным показателем в контрольной группе животных. После обработки НЧС-ПВП у больных туберкулезом мышей количество белка в жидкости бронхо-легочного лаважа снизилось в два раза, что свидетельствует об уменьшении воспаления в легких.

Также ингаляционное введение НЧС-ПВП приводило к восстановлению интенсивности продукции АФК нейтрофилами больных ТБ мышей, что свидетельствует об увеличении бактерицидной активности данных клеток.

Таким образом, после ингаляционного введения НЧС-ПВП мышам, больным хроническим туберкулезом, было отмечено снижение обсемененности органов мышей *M. tuberculosis*, уменьшение воспаления в легких, увеличение бактерицидной активности нейтрофилов и восстановление цитокинового баланса у экспериментальных животных.

На основании полученных данных следует отметить, что препараты, содержащие НЧС-ПВП, могут быть перспективными в мероприятиях профилактики и лечения туберкулеза.

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. enterica* 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 ТБ, 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 ТБ 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 ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АСМ	атомно-силовая микроскопия
АФК	активные формы кислорода
БЛЛ	бронхо-легочный лаваж
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ГКПМ – Оболенск	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур – Оболенск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додецилсульфат натрия
ЗФР	забуференный физиологический раствор
ИЛ-1	интерлейкин 1
ИЛ-1b	интерлейкин 1b
ИЛ-2	интерлейкин 2
ИЛ-4	интерлейкин 4
ИЛ-5	интерлейкин 5
ИЛ-6	интерлейкин 6
ИЛ-10	интерлейкин 10
ИЛ-12	интерлейкин 12
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФН- γ	гамма-интерферон
кДа	килодальтон
КОЕ	колониеобразующая единица
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
МЛУ-ТБ	туберкулез, вызванный возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью

мМ	миллимоль
МТТ	3-(4,5-диметитиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолий бромид
НАДФ (NADP)	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
НЧС	наночастицы серебра
НЧС-ПВП	наночастицы серебра, покрытые поливинилпирролидоном
ПВП	поливинилпирролидон
ППС	полная питательная среда
ТБ	туберкулез
УНТ	углеродные нанотрубки
ФБУН ГНЦ ПМБ	Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
ФНО- α	фактор некроза опухоли-альфа
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ХЛ	хемилюминесценция
Ag	серебро
ALF	искусственная лизосомальная жидкость
С3b	белок системы комплемента
CD	cluster of differentiation (кластеры дифференцировки) – поверхностные дифференцировочные антигены лейкоцитов
DMEM	среда Игла в модификации Дульбекко
<i>In vitro</i>	эксперимент в «пробирке», без участия животных
<i>In vivo</i>	эксперимент на животных
MRSA	метициллин-резистентные штаммы <i>Staphylococcus aureus</i>
pH	водородный показатель
Th1	T-хелперы первого типа
Th2	T-хелперы второго типа
VRSA	ванкомицин-резистентные штаммы <i>Staphylococcus aureus</i>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрусихина, И.Н. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди / И.Н. Андрусихина, И.А. Голуб, Г.Г. Дидикин, С.Е. Литвин, Т.Ю. Громовой, В.Ф. Горчев, В.А. Мовчан // Биотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 51-58.
2. Дерябин, Д. Г. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии / Д.Г. Дерябин, А.С. Васильченко, Е.С. Алешина, А.С. Тлягулова, А.Н. Никиян // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т.5. – № 11-12. – С. 136-141.
3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб, 2010. – 48 с.
4. Ершов, Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю.А. Ершов, Т.В. Плетнева – М. : Медицина, 1989. – 272 с.
5. Криг, Н. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Н. Криг, П. Снит, С. Уильямс, Э. Бок, Д. Хоулт, Р. Беркли, Д. Бун, Дж. Стейли, П. Стин: пер. с англ. – М. : МАКС Пресс, 2007.
6. Литвинова, В.И. Лабораторная диагностика туберкулеза / В.И. Литвинова; под ред. В.И. Литвиновой и А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ, 2001. – 175 с.
7. Лысов, А.В. Эффективность эндолимфатического введения Ронколейкина с комплексом противотуберкулезных препаратов при лечении больных прогрессирующим туберкулезом легких / А.В. Лысов, С.Д. Никонов, Ю.В. Редькин, О.Ю. Анфилофьева, А.В. Казаков, И.В. Буркова // Terra Medica Nova. – 2009. – № 4-5. – С. 13-16.
8. Лядова, И.В. Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования / И.В. Лядова, В.Я. Гергерт // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 9-18.

9. Мильто, И.В. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe₃O₄ / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов, А.В. Ратькин, А.А. Магаева // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 1. – С. 32-36.
10. Мишин, В.Ю. Химиотерапия туберкулеза легких // Пульмонология. – 2008. – № 3. – С. 5-14.
11. Мишин, В.Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулеза легких; под ред. В.Ю. Мишина. – М.: Медицинское информационное агентство, 2007. – 250 с.
12. Мишин, В.Ю. Фтизиопульмонология: учебник / В.Ю. Мишин, Ю.Г. Григорьев, А.В. Митронин, С.П. Завражнов; под ред. В.Ю. Мишина – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 504 с.
13. Мишин, В.Ю. Современные режимы химиотерапии туберкулеза легких, вызванного лекарственно-чувствительными и лекарственно-резистентными микобактериями // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11. – № 21. – С. 234-236.
14. Мишин, В.Ю. Современная стратегия лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких // Лечащий врач. – 2000. – № 3. – С. 4-9.
15. О заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации в 2012 году. Письмо Роспотребнадзора № 01/8843-13-32 от 06.08.2013 [Электронный ресурс]. Федеральная служба по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека, Москва. – 2013. – Режим доступа: http://rospotrebнадzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=678.
16. Перельман, М.И. Фтизиатрия (национальное руководство); под ред. М.И. Перельмана. – М.: ГЭОТАР Медиа, 2007. – 512 с.
17. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 13.10.2010 № 18713). – 2010. – 22 с.
18. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных // Institute of Laboratory Animals Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. – National Academy Press: Washington. – 1996. – 138 с.

19. Свирщевская, Е.В. Иммуитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор) / Е.В.Свирщевская, В.С. Митрофанов, Р.И. Шендерова, Н.М. Чужова // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 3-13.
20. Хоменко, А.Г. Повышенный апоптоз иммунокомпетентных клеток как один из возможных механизмов в развитии иммунодефицита у больных остро-прогрессирующим туберкулезом / А.Г. Хоменко, Л.В. Ковальчук, В.Ю. Мишин // Пробл. туберкулеза. – 1996. – № 6. – С. 6-10.
21. Чернушенко, Е.Ф. Противотуберкулезный иммунитет / Е.Ф. Чернушенко, Р.Г. Процюк // Український пульмонологічний журнал. – 2010. – № 4. – С. 53-58
22. Шумакова, А.А. Токсиколого-гигиеническая характеристика наночастиц серебра, вводимых в желудочно-кишечный тракт крыс / А.А. Шумакова, В.В. Смирнова, О.Н. Тананова, Э.Н. Трушина, Л.В. Кравченко, И.В. Аксенов, А.В. Селифанов, С.Х. Сото, Г.Г. Кузнецова, А.В. Булахов, И.В. Сафенкова, И.В. Гмошинский, С.А. Хотимченко // Вопросы питания. – 2011. – Т. 80. – № 6. – С. 9-18.
23. Ahamed, M. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells / M. Ahamed, M. Karns, M. Goodson, J. Rowe, S.M. Hussain, J.J. Schlager, Y. Hong // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2008. – Vol. 233, N 3. – P. 404-410.
24. Alexander, J.W. History of the medical use of silver // Surg Infect (Larchmt). – 2009. – Vol. 10, N 3. – P. 289-292.
25. Allen, B.L. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis / B.L. Allen, P.D. Kichambare, P. Gou, I.I. Vlasova, A.A. Kapralov, N. Konduru, V.E. Kagan, A. Star // Nano Lett. – 2008. – Vol. 8, N 11. – P. 3899-3903.
26. Alphanđary, H.P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications / H.P. Alphanđary, A. Andremont, P. Couvreur // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2000. – Vol. 13. – P. 155-168.

27. Andon, F. T. Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials / F.T. Andon, B. Fadeel // *Acc. Chem. Res.* – 2013. – Vol. 46, N 3. – P. 733-742.

28. Andrade, F. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases / F. Andrade, D. Rafael, M. Videira, D. Ferreira, A. Sosnik, B. Sarmiento // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2013. – Vol. 65, N 13-14. – P. 1816-1827.

29. Arias, L.R. Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions / L.R. Arias, L.J. Yang // *Langmuir.* – 2009. – Vol. 25. – P. 3003-3012.

30. Arora, S. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells / S. Arora, J. Jain, J. Rajwade, K. Paknikar // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 236, N 3. – P. 310-318.

31. Asare, N. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells / N. Asare, C. Instanes, W.J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg // *Toxicology.* – 2012. – Vol. 291, N 1-3. – P. 65-72.

32. AshaRani, P.V. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells / P.V. AshaRani, G.L.K. Mun, M.P. Hande, S. Valiyaveetil // *ACS Nano.* – 2009. – Vol. 3, N 2. – P. 279-290.

33. Ashkarran, A.A. Bacterial effects and protein corona evaluations: crucial ignored factors in the prediction of bioefficacy of various forms of silver nanoparticles / A.A. Ashkarran, M. Ghavami, H. Aghaverdi, P. Stroeve, M. Mahmoudi // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – Vol. 25, N 6. – P. 1231-1242.

34. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Silver. Clement international corporation [Электронный ресурс] // U.S. public Health Service. ATSDR/TP-90-24. – 1990. – Режим доступа: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp146.pdf.

35. Avalos A. Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts [Электронный ресурс] / A. Avalos, A.I. Haza, D. Mateo, P. Morales // *Int. Wound J.* – 2014. – Режим доступа: doi: 10.1111/iwj.12244.

36. Avalos, A. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells / A. Avalos, A.I. Haza, D. Mateo, P. Morales // *J Appl Toxicol.* – 2014. – Vol. 34, N 4. – P. 413-423.
37. Bar-Ilan, O. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos / O. Bar-Ilan, R. Albrecht, V. Fako, D. Furgeson // *Small.* – 2009. – Vol. 17. – P. 897-910.
38. Beer, C. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? / C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 208, N 3. – P. 286-292.
39. Bhol, K.C. Anti-inflammatory effect of topical nanocrystalline silver cream on allergic contact dermatitis in a guinea pig model / K.C. Bhol, J. Alroy, P.J. Schechter // *Clin Exp Dermatol.* – 2004. – Vol. 29. – P. 282-287.
40. Bouwmeester, H. Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on wholegenome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model / H. Bouwmeester, J. Poortman, R.J. Peters, E. Wijma, E. Kramer, S. Makama, K. Puspitaninganindita, H.J. Marvin, A.A. Peijnenburg, P.J. Hendriksen // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, N 5. – P. 4091-4103.
41. Braydich-Stolle, L.K. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells / L.K. Braydich-Stolle, B. Lucas, A. Schrand, R.C. Murdock, T. Lee, J.J. Schlager, S.M. Hussain, M.C. Hofmann // *Toxicol. Sci.* – 2010. – Vol. 116, N 2. – P. 577-589.
42. Cardona, P.J. Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity // Croatia: InTech. – 2012. – 560 p.
43. Carlson, C. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species / C. Carlson, S.M. Hussain, A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones, J.J. Schlager // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – Vol. 112, N 43. – P. 13608-13619.
44. Carryn, S. Comparative intracellular (THP-1 macrophage) and extracellular activities of beta-lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against Lis-

teria monocytogenes at clinically relevant concentrations / S. Carryn, F. Van Bambeke, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – P. 2095-2103.

45. Chaudhry, Q. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector / Q. Chaudhry, M. Scotter, J. Blackburn, B. Ross, A. Boxall, L. Castle, R. Aitken, R. Watkins // *Food Addit. Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* – 2008. – Vol. 25, N 3. – P. 241-258.

46. Chmielowiec-Korzeniowska, A. Bactericidal, fungicidal and virucidal properties of nanosilver. Mode of action and potential application. A review / A. Chmielowiec-Korzeniowska, L. Krzosek, L. Tymczynna, M. Pyrz, A. Drabik // *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska.* – 2013. – Vol. 31, N 2. – P. 1-11.

47. Choi, O. Size Dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria / O. Choi, Z. Hu // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42. – P. 4583-4588.

48. Chonn A. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes / *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – P. 4234-4241.

49. Chrastina, A. Iodine-125 radiolabeling of silver nanoparticles for in vivo SPECT imaging / A. Chrastina, J.E. Schnitzer // *Int. J. Nanomedicine.* – 2010. – Vol. 5. – P. 653-659.

50. Coligan, E.J. Short protocols in immunology: a compendium of methods from current protocols in immunology / E.J. Coligan, E.B. Bierer, H.D. Margulies, E.M. Shevach, W. Stroder // Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc. – 2005.

51. Coyle, P. Metallothionein: The multipurpose protein / P. Coyle, J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe // *Cellul. Molecul. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59, N 4. – P. 627-647.

52. De Jong, W.H. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats / W.H. De Jong, L.M. van der Ven, A. Sleijffers, M.V.D.Z. Park, E.H.J.M. Jansen, H. van Loveren, R.J. Vandebriel // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, N 33. – P. 8333-8343.

53. Dobrovolskaia, M. A. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution / M.A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil // *Mol Pharm.* – 2008. – Vol. 5, N 4. – P. 487-95.

54. Dodeigne, C. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review / C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune // *Talanta.* – 2000. – Vol. 51. – P. 415-439.

55. Dong, L. Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes Suspended in Different SurfactantsL [Электронный ресурс] / L. Dong, A. Henderson, C. Field // *Journal of Nanotechnology.* – 2012. – Vol. 2012. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/928924>.

56. Drake, P.L. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review / P.L. Drake, K.J. Hazelwood // *Ann. of Occup. Hyg.* – 2005. – Vol. 49, N 7. – P. 575-585.

57. Dye, C. Eliminating human tuberculosis in the twenty-first century / C. Dye, B.G. Williams // *J. R. Soc. Interface.* – 2008. – Vol. 5. – P. 653-662.

58. Dziendzikowska, K. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats / K. Dziendzikowska, J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, M. Oczkowski, A. Krawczynska, J. Chwastowska, M. Sadowska-Bratek, E. Chajduk, M. Wojewodzka, M. Dusinska, M. Kruszewski // *J. Appl. Toxicol.* – 2012. – Vol. 32, N 11. – P. 920-928.

59. Egger, S. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material / S. Egger, R.P. Lehmann, M.J. Height, M.J. Loessner, M. Schuppler // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 2973-2976.

60. Elechiguerra, J.L. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 / J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara, M.J. Yacaman // *J. Nanobiotechnol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 6-15.

61. Eom, H. J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells / H.J. Eom, J. Choi // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44, N 21. – P. 8337-8342.

62. Fabrega, J. Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria / J. Fabrega, R. Zhang, J.C. Renshaw, W.T. Liu, J.R. Lead // *Chemosphere*. – 2011. – Vol. 85. – P. 961-966.

63. Fayaz, A.M. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria / A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, M. Tech, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan // *Nanomedicine*. – 2010. – Vol. 6. – P. 103-109.

64. Flower, N.A. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay / N.A. Flower, B. Brabu, M. Revathy, C. Gopalakrishnan, S.V. Raja, S.S. Murugan, T.S. Kumaravel // *Mutat. Res.* – 2012. – Vol. 742, N 1-2. – P. 61-65.

65. Foldbjerg, R. Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver / R. Foldbjerg, E.S. Irving, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, K. Thorsen, H. Autrup, C. Beer // *Toxicol. Sci.* – 2012. – Vol. 130, N 1. – P. 145-157.

66. Foldbjerg, R. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549 / R. Foldbjerg, D.A. Dang, H. Autrup // *Arch. Toxicol.* – 2011. – Vol. 85, N 7. – P. 743-750.

67. Foldbjerg, R. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes / R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffmann, H. Autrup // *Toxicol. Lett.* – 2009. – Vol. 190, N 2. – P. 156-162.

68. Franco, R. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trios / R. Franco, R. Sanchez-Olea, E.M. Reyes-Reyes, M.I. Panayiotidis // *Mutat. Res.* – 2009. – Vol. 674, N 1-2. – P. 3-22.

69. Galluzzi, L. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 / L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni,

P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer // *Cell Death. Differ.* – 2012. – Vol. 19, N 1. – P. 107-120.

70. Garza-Ocanas, L. Biodistribution and long-term fate of silver nanoparticles functionalized with bovine serum albumin in rats / L. Garza-Ocanas, D.A. Ferrer, J. Burt, L.A. Diaz-Torres, C.M. Ramirez, V.T. Rodriguez, R.R. Lujan, D. Romanovicz, M. Jose-Yacamán // *Metallomics.* – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 204-210.

71. Gondikas, A.P. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation / A.P. Gondikas, A. Morris, B.C. Reinsch, S.M. Marinakos, G.V. Lowry, H. Hsu-Kim // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 46, N 13. – P. 7037-7045.

72. Gurunathan, S. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. [Электронный ресурс] / S. Gurunathan, J.W. Han, V. Eppakayala, M. Jeyaraj, J.H. Kim // *BioMed Res Int.* – 2013. – Vol. 2013. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/535796>

73. Haase, A. Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses / A. Haase, H.F. Arlinghaus, J. Tentschert, H. Jungnickel, P. Graf, A. Mantion, F. Draude, S. Galla, J. Plendl, M.E. Goetz, A. Masic, W. Meier, A.F. Thunemann, A. Taubert, A. Luch // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, N 4. – P. 3059-3068.

74. Hackenberg, S. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells / S. Hackenberg, A. Scherzed, M. Kessler, S. Hummel, A. Technau, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen, N. Kleinsasser // *Toxicol. Lett.* – 2011. – Vol. 201, N 1. – P. 27-33.

75. Hadrup, N. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats / N. Hadrup, K. Loeschner, A. Bergstrom, A. Wilcks, X. Gao, U. Vogel, H.L. Frandsen, E.H. Larsen, H.R. Lam, A. Mortensen // *Arch. Toxicol.* – 2012. – Vol. 86, N 4. – P. 543-551.

76. Han J.W. Oxidative stress mediated cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line [Электронный ресурс] / J.W. Han, S. Gurunathan, J.K. Jeong, Y.J. Choi, D.N. Kwon, J.K. Park, J.H. Kim // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – Vol. 9. – Режим доступа: <http://www.nanoscalereslett.com/content/9/1/459>.

77. Hawley, A.E. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics / A.E. Hawley, S.S. Davis, L. Illum // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1995. – Vol. 17. – P. 129-148.

78. Higuchi, M. Transport of colloidal particles in lymphatics and vasculature after subcutaneous injection / M. Higuchi, A. Fokin, T.N. Masters, F. Robicsek, G.W. Schmid-Schonbein // *J. Applied Physiology*. – 1999. – Vol. 86. – P. 1381-1387.

79. Hsin, Y.H. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells / Y.H. Hsin, C.F. Chena, S. Huang, T.S. Shih, P.S. Lai, P.J. Chueh // *Toxicol. Lett.* – 2008. – Vol. 179, N 3. – P. 130-139.

80. Hua, H. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine [Электронный ресурс] / H. Hua, L.A. Pham-Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, Ch. Pham-Huy // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/578290>.

81. Hussain, S.M. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells / S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlagger // *Toxicol in Vitro*. – 2005. – Vol. 19, N 7. – P. 975-983.

82. Hwang, E.T. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria / E.T. Hwang, J.H. Lee, Y.J. Chae, Y.S. Kim, B.C. Kim, B. Sang, M.B. Gu // *Small*. – 2008. – Vol. 4. – P. 746-750.

83. Hyun, J.S. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats / J.S. Hyun, B.S. Lee, H.Y. Ryu, J.H. Sung, K.H. Chung, I.J. Yu // *Toxicol. Lett.* – 2008. – Vol. 182, N 1-3. – P. 24-28.

84. Ikomi, F. Size- and surface-dependent uptake of colloid particles into the lymphatic system / F. Ikomi, G.K. Hanna, G.W. Schmid-Schonbein // *Lymphology*. – 1999. – Vol. 32. – P. 90-102.

85. Infante-Duarte, C. Th1/Th2 balance in infection / C. Infante-Duarte, T. Kamradt // *Springer Semin Immunopathol.* – 1999. – Vol. 21, N 3. – P. 317-338.

86. Jackson, P. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes [Электронный ресурс] / P. Jackson, N.R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K.A. Jensen, U.H. Vogel // *Chemistry Central Journal*. – 2013. – Vol. 7, N 154. – Режим доступа: <http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/154>.

87. Jain, D. Novel microbial route to synthesize silver nanoparticles using spore crystal mixture of *Bacillus thuringiensis* / D. Jain, S. Kachhwaha, R. Jain, G. Srivastava, S.L. Kothari // *Ind J Exp Biology*. – 2010. – Vol. 48, N 11. – P. 1152-1156.

88. Ji, J.H. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in SpragueDawley rats / J.H. Ji, J.H. Jung, S.S. Kim, J.U. Yoon, J.D. Park, B.S. Choi, Y.H. Chung, I.H. Kwon, J. Jeong, B.S. Han, J.H. Shin, J.H. Sung, K.S. Song, I.J. Yu // *Inhal. Toxicol.* – 2007. – Vol. 19, N 10. – P. 857-871.

89. Kang, S.J. Silver nanoparticles-mediated G2/M cycle arrest of renal epithelial cells is associated with NRF2-GSH signaling / S.J. Kang, Y.J. Lee, E.K. Lee, M.K. Kwak // *Toxicol. Lett.* – 2012. – Vol. 211, N 3. – P. 334-341.

90. Kaufmann, S.H.E. *Methods in microbiology. Immunology of infection. Second Edition* / S.H.E. Kaufmann, D. Kabelitz // London: Acad. Press – 2002. – Vol. 32. – 806 p.

91. Kaufmann, S.H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? // *Nat Rev Immunol.* – 2001. – Vol. 1, N 1. – P. 20-30.

92. Kawata, K. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells / K. Kawata, M. Osawa, S. Okabe // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43, N 15. – P. 6046-6051.

93. Kennedy, A. J. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms / A.J. Kennedy, M.S. Hull, A.J. Bednar, J.D. Goss,

J.C. Gunter, J.L. Bouldin, P.J. Vikesland, J.A. Steevens // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44, N 24. – P. 9571-9577.

94. Kilinc, O. Risk of tuberculosis among healthcare workers: can tuberculosis be considered as an occupational disease? / O. Kilinc, E.S. Ucan, M.D.A. Cakan, M.D. Ellidokuz, M.D. Ozol, A. Sayiner, M.D. Ozsoz. // *Respir. Med.* – 2002. – Vol. 96. – P. 506-510.

95. Kim, H.R. Genotoxic effects of silver nanoparticles stimulated by oxidative stress in human normal bronchial epithelial (BEAS 2B) cells / H.R. Kim, M.J. Kim, S.Y. Lee, S.M. Oh, K.H. Chung // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 726. – P. 129-135.

96. Kim, J. S. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure // J.S. Kim, J.H. Sung, J.H. Ji, K.S. Song, J.H. Lee, C.S. Kang, I.J. Yu // *Saf Health Work.* – 2011. – Vol. 2, N 1. – P. 34-38.

97. Kim, J.S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho // *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* – 2007. – Vol. 3. – P. 95-101.

98. Kim, S. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells / S. Kim, J.E. Choi, J. Choi, K.H. Chung, K. Park, J. Yi, D.Y. Ryu // *Toxicol. In Vitro.* – 2009. – Vol. 23, N 6. – P. 1076-1084.

99. Kim, T.H. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles / T.H. Kim, M. Kim, H.S. Park, U.S. Shin, M.S. Gong, H.W. Kim // *Journal of Biomedical Materials Research A.* – 2012. – Vol. 100, N 4. – P. 1033-1043.

100. Kim, Y.S. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles [Электронный ресурс] / Y.S. Kim, M.Y. Song, J.D. Park, K.S. Song, H.R. Ryu, Y.H. Chung, H.K. Chang, J.H. Lee, K.H. Oh, B.J. Kelman, I.K. Hwang, I.J. Yu // *Part. Fibre Toxicol.* – 2010. – Vol. 7, N 20. – Режим доступа:

<http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/20>.

101. Kim, Y.S. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats / Y.S. Kim, J.S. Kim, H.S. Cho, D.S. Rha, J.M. Kim, J.D. Park, B.S. Choi, R. Lim, H.K. Chang, Y.H. Chung,

I.H. Kwon, J.Jeong, B.S. Han, I.J. Yu // *Inhal. Toxicol.* – 2008. – Vol. 20 , N 6. – P. 575-583.

102. Kirsner, R. Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver / R. Kirsner, H. Orsted, B. Wright // *Wounds.* – 2001. – Vol. 13. – P. 5-10.

103. Kittler, S. Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions / S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Koller, M. Epple // *Chem.Materl.* – 2010. – Vol. 22, N 16. – P. 4548-4554.

104. Klueh, U. Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation / U. Klueh, V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J.D. Bryers // *J Biomed Mater Res.* – 2000. – Vol. 53. – P. 621-631.

105. Korani, M. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig / M. Korani, S.M. Rezayat, K. Gilani, S. Arbabi Bidgoli, S. Adeli // *Intern. J. Nanomedicine.* – 2011. – Vol. 6. – P. 855-862.

106. Kristiansen, S. Ultrastructural localization and chemical binding of silver ions in human organotypic skin cultures / S. Kristiansen, P. Ifversen, G. Danscher // *Histochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 130, N 1. – P. 177-184.

107. Lacerda, L. Dynamic imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion / L. Lacerda, A. Soundararajan, R. Singh, G. Pastorin, K.T. Al-Jamal, J. Turton, P. Frederik, M.A. Herrero, S.L.A. Bao, D. Emfietzoglou / *Adv Mater.* – 2008. – Vol. 20. – P. 225-230.

108. Lam, C.W. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks / C.W. Lam, J.T. James, R. McCluskey, S. Arepalli, R.L. Hunter // *Crit Rev Toxicol.* – 2006. – Vol. 36, N 3. – P. 189-217.

109. Lankveld, D. P. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes / D.P. Lankveld, A.G. Oomen, P.Krystek, A. Neigh, J.A. Troost-de, C.W. Noorlander, J.C. Van Eijkeren, R.E. Geertsma, W.H. De Jong // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, N 32. – P. 8350-8361.

110. Larese, F.F. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin / F.F. Larese, F. D'Agostin, M. Crosera, G. Adami, N. Renzi, M. Bovenzi, G. Maina // *Toxicol.* – 2009. – Vol. 255, N 1-2. – P. 33-37.
111. Leid, J.G. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria / J.G. Leid, A.J. Ditto, A. Knapp, P.N. Shah, B.D. Wright, R. Blust // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67, N 1. – P.138-148.
112. Li, Y. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay / Y. Li, D.H. Chen, J. Yan, Y. Chen, R.A. Mittelstaedt, Y. Zhang, A.S. Biris, R.H. Heflich, T. Chen // *Mutat. Res.* – 2012. – Vol. 745, N 1-2. – P. 4-10.
113. Liao, S.Y. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions / S.Y. Liao, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 25. – P. 279-283.
114. Liu, J. Chemical transformations of nanosilver in biological environments / J. Liu, Z. Wang, F.D. Liu, A.B. Kane, R.H. Hurt // *ACS Nano.* – 2012. – Vol. 6, N 11. – P. 9887-9899.
115. Liu, J. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces / J. Liu, D.A. Sonshine, S. Shervani, R.H. Hurt // *ACS Nano.* – 2010. – Vol. 4, N 11. – P. 6903-6913.
116. Liu, J. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids / J. Liu, R.H. Hurt // *Environ. Sci. Technol.* – 2010. – Vol. 44, N 6. – P. 2169-2175.
117. Liu, S. Sharper and faster nano darts kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube / S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M.W. Chang, R. Xu // *ACS Nano.* – 2009. – Vol. 3, N 12. – P. 3891-3902.
118. Liu, W. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size / W. Liu, Y. Wu, C. Wang, H.C. Li, T. Wang, C.Y. Liao, L. Cui, Q.F. Zhou, B. Yan, G.B. Jiang // *Nanotoxicol.* – 2010. – Vol. 4, N 3. – P. 319-330.

119. Loeschner, K. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate [Электронный ресурс] / K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H.R. Lam, E.H. Larsen // *Part. Fibre Toxicol.* – 2011. – Vol. 8, N 18. – Режим доступа: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/18>.

120. Lok, C.N. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles / C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, J.F. Chiu, P. Kwong-Hang Tam, C.M. Che // *J. Proteome Res.* – 2006. – Vol. 5. – P. 916-924.

121. Madani, S.Y. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools / S.Y. Madani, N. Naderi, O. Dissanayake, A. Tan, A.M. Seifalian // *Int J Nanomedicine.* – 2011. – Vol. 6. – P. 2963-2979.

122. Matsumura, Y. Appl. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate / Y. Matsumura, K. Yoshikata, S.I. Kunisaki, T. Tsuchido // *Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69. – P. 4278-4281.

123. Maynard, A. D. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond / A.D. Maynard, D.B. Warheit, M.A. Philbert // *Toxicol. Sci.* – 2011. – Vol. 120, N 1. – P. 109-129.

124. Miethling-Graff, R. Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells / R. Miethling-Graff, R. Rumpker, M. Richter, T. Verano-Braga, F. Kjeldsen, J. Brewer, J. Hoyland, H.G. Rubahn, H. Erdmann // *Toxicol In Vitro.* – 2014. – Vol. 28, N 7. – P. 1280-1289.

125. Miranda, M.S. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? [Электронный ресурс] / M.S. Miranda, A. Breiman, S. Allain, F. Deknuydt, F. Altare // *Clinical and Developmental Immunology.* – 2012. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395138/pdf/CDI2012-139127.pdf>

126. Monopoli, M.P. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials / M.P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K.A. Dawson // *Nat. Nanotechnol.* – 2012. – Vol. 7, N 12. – P. 779-786.

127. Monopoli, M.P. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles / M.P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F.B. Bombelli, K.A. Dawson // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133, N 8. – P. 2525-2534.

128. Morones, J.R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, J.T. Ramirez // *Nanotechnology.* – 2005. – Vol. 16. – P. 2346-2353.

129. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunological Methods.* – 1983. – Vol. 65, N 1-2. – P. 55-63.

130. Mu, Q. Endosomal Leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake / Q. Mu, D.L. Broughton, B. Yan // *Nano Lett.* – 2009. – Vol. 9, N 12. – P. 4370-4375.

131. Muller, J. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes / J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J.F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Lison // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 207, N 3. – P. 221-231.

132. Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance [Электронный ресурс] / Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 4th plenary of 12 December 2013. European Commission, 2013. – 102 p. – Режим доступа: http://www.biozid.info/uploads/media/scenih_r_preliminary_opinion_nanosilver.pdf

133. Navarro, E. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra // *Environ. Sci. Tech.* – 2008. – Vol. 42, N 23. – P. 8959-8964.

134. Nel, A. Toxic potential of materials at the nanolevel / A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li // *Science.* – 2006. – Vol. 311, N 5761. – P. 622-627.

135. Nguyen, K.C. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles [Электронный ресурс] / K.C. Nguyen, V.L. Seligy, A. Massarsky, T.W. Moon,

P. Rippstein, J. Tan, A.F. Tayabali // J. Physics: Conference Series. – 2013. – Vol. 429. – Режим доступа: <http://iopscience.iop.org/1742-6596/429/1/012025>.

136. Nymark, P. Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells / P. Nymark, J. Catalan, S. Suhonen, H. Jarventaus, R. Birkedal, P.A. Clausen, K.A. Jensen, M. Vippola, K. Savolainen, H. Norppa // Toxicology. – 2013. – Vol. 313. – P. 38-48.

137. Oberdorster, G. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy [Электронный ресурс] / G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman // Part Fibre Toxicol. – 2005. – Vol. 2, N 8. – Режим доступа: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/2/1/8>.

138. Oberdorster, G. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles / G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster // Environmental Health Perspectives. – 2005. – Vol. 113, N 7. – P. 823-839.

139. Panatarotto, D. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses / D. Panatarotto, C.D. Prtidos, J. Hoebeke, F. Brown, E. Kramer, J.P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco // Chemistry&Biology. – 2003. – Vol. 10. – P. 961-966.

140. Park, E.J. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism / E.J. Park, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, K. Park // Toxicol. In Vitro. – 2010. – Vol. 24, N 3. – P. 872-878.

141. Park, E.J. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles / E.J. Park, E. Baeb, J. Yib, Y. Kim, K. Choid, S.H. Leed, J. Yoond, B.C. Leed, K. Park // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2010. – Vol. 30. – P. 162-168.

142. Park, K. Bioavailability and toxicokinetics of citratecoated silver nanoparticles in rats / K. Park, E.J. Park, I.K. Chun, K. Choi, S.H. Lee, J. Yoon, B.C. Lee // Arch. Pharm. Res. – 2011. – Vol. 34, N 1. – P. 153-158.

143. Park, M.V. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles / M.V. Park, A.M. Neigh,

J.P. Vermeulen, L.J. de la Fonteyne, H.W. Verharen, J.J. Briede, W.H. De Jong // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, N 36. – P. 9810-9817.

144. Percival, S.L. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model / S.L. Percival, P.G. Bowler, J. Dolman // *Int Wound J*. – 2007. – Vol. 4. – P. 186-191.

145. Piao, M.J. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis / M.J. Piao, K.A. Kang, I.K. Lee, H.S. Kim, S. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, J.W. Hyun // *Toxicol. Lett*. – 2011. – Vol. 201, N 1. – P. 92-100.

146. Pierce, L.A. Antibiotic effects on phagocyte chemiluminescence in vitro / L.A. Pierce, W.O. Tarnow-Mordi, I.A. Cree // *International Journal of Clinical and Laboratory Research*. – 1995. – Vol. 25, N 2. – P. 93-98.

147. Praba, V.L. Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles Against *Mycobacterium tuberculosis* / V.L. Praba, M. Kathirvel, K. Vallayyachari, K. Surendar, M. Muthuraj, P.J. Jesuraj, S. Govindarajan, K.V. Raman // *Journal of Bionanoscience*. – 2013. – Vol. 7. – P.1-6.

148. Prabhu, S. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects [Электронный ресурс] / S. Prabhu, E.K. Poulouse // *International Nano Letters*. – 2012. – Vol. 2, N 32. – Режим доступа: <http://www.inl-journal.com/content/2/1/32>.

149. Raffi, M. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224 / M. Raffi, F. Hussain, T.M.Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, M.M.Hasan // *J. Mater. Sci. Technol*. – 2008. – Vol. 24, N 2. – P.192-196.

150. Rai, M.K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria / M.K. Rai, S.D. Deshmukh, A.P. Ingle, A.K. Gade // *Journal of Applied Microbiology*. – 2012. – Vol. 112, N 5. – P. 841-852.

151. Rai, M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // *Biotechnol Adv*. – 2009. – Vol. 27. – P.76-83.

152. Rogers, E.J. A high throughput in vitro analytical approach to screen for oxidative stress potential exerted by nanomaterials using a biologically relevant matrix:

human blood serum / E.J. Rogers, S.F. Hsieh, N. Organti, D. Schmidt, D. Bello // *Toxicol. In Vitro.* – 2008. – Vol. 22, N 6. – P. 1639-1647.

153. Rogers, K.R. Alterations in physical state of silver nanoparticles exposed to synthetic human stomach fluid / K.R. Rogers, K. Bradham, T. Tolaymat, D.J. Thomas, T. Hartmann, L. Ma, A. Williams // *Sci. Total Environ.* – 2012. – Vol. 420. – P. 334-339.

154. Rogovine, V.V. The increasing effect of some synthetic peptides on luminol-dependent chemiluminescence of mouse blood / V.V. Rogovine, V.M. Mushtakova // *Cell Biochem Func.* – 1995. – Vol. 13, N 1. – P. 15-18.

155. Saeed, K. Review of properties, dispersion and toxicology of carbon nanotubes // *J. Chem. Soc. Pak.* – 2010. – Vol. 32, N 4. – P. 559-564.

156. Sahu, S.C. Nanotoxicity. From *in vivo* and *in vitro* models to health risks / S.C. Sahu, D.A. Casciano // Chichester: John Wiley and Sons Ltd. – 2009. – 609 p.

157. Saifuddin, N. Carbon Nanotubes: A Review on Structure and Their Interaction with Proteins [Электронный ресурс] / N. Saifuddin, A.Z. Raziah, A.R. Junizah // *Journal of Chemistry.* – 2013. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676815>.

158. Salvador-Morales, C. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes / C. Salvador-Morales, E. Flahaut, E. Sim, J. Sloan, M.L.H. Green, R.B. Sim // *Mol. Immunol.* – Vol. 43. – P. 193-201.

159. Samberg, M.E. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro* / M.E. Samberg, S.J. Oldenburg, N.A. Monteiro-Riviere // *Environ. Health Perspect.* – 2010. – Vol. 118, N 3. – P. 407-413.

160. Sarkar, S. An Overview of Tuberculosis Chemotherapy – A Literature Review / S. Sarkar, M.R. Suresh // *J Pharm Pharmaceut Sci.* – 2011. – Vol. 14, N 2. – P. 148-161.

161. Sarsar, V. Nanosilver: Potent antimicrobial agent and its biosynthesis / V. Sarsar, K.K. Selwal, M.K. Selwal // *African Journal of Biotechnology.* – 2014. – Vol. 13, N 4. – P. 546-554.

162. Saunders, B.M. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis / B.M. Saunders, W.J. Britton // *Immunol Cell Biol.* – 2007. – Vol. 85, N 2. – P. 103-111.

163. Seral, C. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages / C. Seral, F. Van Bambeke, P.M. Tulkens // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 2283-2292.

164. Seth, D. Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis / D. Seth, S.R. Choudhury, S. Pradhan, S. Gupta, D. Palit, S. Das, N. Debnath, A. Goswami // *Curr Microbiol.* – 2011. – Vol. 62, N 3. – P. 715-726.

165. Sezer, A.D. Application of nanotechnology in drug delivery // *Croatia: InTech.* – 2014. – 552 p.

166. Shahverdi, A.R. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi, S. Minaian // *Nanomedicine.* – 2007. – Vol. 3. – P. 168-171.

167. Sharma, V.K. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities / V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Liu // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2008. – Vol. 145. – P. 83-96.

168. Shrivastava, S. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles / S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash. // *Nanotechnol.* – 2008. – Vol.18. – P.103-112.

169. Shvedova, A.A. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single walled carbon nanotubes in mice [Электронный ресурс] / A.A. Shvedova, E.R. Kisin, R. Mercer, A.R. Murray, V.J. Johnson, A.I. Potapovich, Y.Y. Tyurina, O. Gorelik, S. Arepalli, D. Schwegler-Berry, A.F. Hubbs, J. Antonini, D.E. Evans, B.K. Ku, D. Ramsey, A. Maynard, V.E. Kagan, V. Castranova, P. Baron // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 289,

N 5. – Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15951334&query_hl=1.

170. Singh, R. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers / R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco, K. Kostarelos // *Proc Nat Acad Sci USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 3357-3362.

171. Skerry, C. Adjunctive TNF inhibition with standard treatment enhances bacterial clearance in a murine model of necrotic TB granulomas [Электронный ресурс] / C. Skerry, J. Harper, M. Klunk, W.R. Bishai, S.K. Jain // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 6. – doi:10.1371. Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039680>.

172. Soderstjerna, E. Silver and Gold Nanoparticles Exposure to In Vitro Cultured Retina – Studies on Nanoparticle Internalization, Apoptosis, Oxidative Stress, Glial- and Microglial Activity [Электронный ресурс] / E. Soderstjerna, P. Bauer, T. Cedervall, H. Abdshill, F. Johansson, U.E. Johansson // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9, N 8. – Режим доступа: e105359. doi:10.1371/journal.pone.0105359.

173. Sondi, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria / I. Sondi, B. Salopek-Sondi // *J Colloid Interface Sci*. – 2004. – Vol. 275. – P.177-182.

174. Song, H.Y. Fabrication of Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Mechanisms / H.Y. Song, K.K. Ko, I.H. Oh, B.T. Lee // *European Cells and Materials*. – 2006. – Vol. 11, N 1. – P. 58.

175. Song, K.S. Recovery from silvernanoparticle-exposure-induced lung inflammation and lung function changes in Sprague Dawley rats / K.S. Song, J.H. Sung, J.H. Ji, J.H. Lee, J.S. Lee, H.R. Ryu, J.K. Lee, Y.H. Chung, H.M. Park, B.S. Shin, H.K. Chang, B. Kelman, I. Yu // *J.Nanotoxicol*. – 2013. – Vol. 7, N 2. – P. 169-180.

176. Stebounova, L.V. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model [Электронный ресурс] / L.V. Stebounova, A. Adamcakova-Dodd, J.S. Kim, H. Park, P.T. O'Shaughnessy,

V.H. Grassian, P.S. Thorne // *Part Fibre Toxicol.* – 2011. – Vol. 8, N 5. – Режим доступа: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/8/1/5>.

177. Stebounova, L.V. Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution / L.V. Stebounova, E. Guio, V.H. Grassian // *J. of Nanopart. Res.* – 2011. – Vol. 13, N 1. – P. 233-244.

178. Sung, J.H. Acute inhalation toxicity of silver nanoparticles / J.H. Sung, J.H. Ji, K.S. Song, J.H. Lee, K.H. Choi, S.H. Lee, I.J. Yu // *Toxicol. Ind. Health.* – 2011. – Vol. 27, N 2. – P. 149-154.

179. Sung, J.H. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles / J.H. Sung, J.H. Ji, J.D. Park, J.U. Yoon, D.S. Kim, K.S. Jeon, M.Y. Song, J. Jeong, B.S. Han, J.H. Han, Y.H. Chung, H.K. Chang, J.H. Lee, M.H. Cho, B.J. Kelman, I.J. Yu // *Toxicol. Sci.* – 2009. – Vol. 108, N 2. – P. 452-461.

180. Sung, J.H. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles / J.H. Sung, J.H. Ji, J.U. Yoon, D.S. Kim, M.Y. Song, J. Jeong, B.S. Han, J.H. Han, Y.H. Chung, J. Kim, T.S. Kim, H.K. Chang, E.J. Lee, J.H. Lee, I.J. Yu // *Inhal. Toxicol.* – 2008. – Vol. 20, N 6. – P. 567-574.

181. Suresh, A.K. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types / A.K. Suresh, D.A. Pelletier, W. Wang, J.L. Gu, B. Morrell-Falvey, M.J. Doktycz // *Langmuir.* – 2012. – Vol. 28, N 5. – P. 2727-2735.

182. Takenaka, S. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats / S. Takenaka, E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel, J. Heyder // *Environ. Health Perspect.* – 2011. – Vol. 109. – P. 547-551.

183. Tang, J. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats / J. Tang, L. Xiong, S. Wang, J. Wang, L. Liu, J. Li, F. Yuan, T. Xi // *J. Nanoscience and Nanotechnology.* – 2009. – Vol. 9, N 8. – P. 4924-4932.

184. Tegos, A. Antimicrobial drug discovery: emerging strategies [Электронный ресурс] // Wallingford: CABI. – 2012. – Режим доступа: <http://www.cabi.org/CABeBooks/default.aspx?site=107&page=45&LoadModule=PDFHier&BookID=705>.

185. Tian, J. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing / J.Tian, K.K. Wong, C.M. Ho, C.N. Lok, W.Y. Yu, C.M. Che, J.F. Chiu, P.K. Tam // Chem Med Chem. – 2007. – Vol. 2. – P. 129-136.

186. Tolaymat, T.M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers / T.M. Tolaymat, A.M. El Badawy, A. Genaidy, K.G. Scheckel, T.P. Luxton, M. Suidan // Sci. Total Environ. – 2010. – Vol. 408, N 5. – P. 999-1006.

187. Trop, M. Silver coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient / M. Trop, M. Novak, S. Rodl, B. Hellbom, W. Kroell, W. Goessler // J. Trauma-Injury Infect. Crit. Care. – 2006. – Vol. 60, N 3. – P. 648-652.

188. Tsuyuguchi, I. Immunology of tuberculosis and cytokines // Kekkaku. – 1995. – Vol. 70, N 5. – P. 335-346.

189. U.S. EPA. Nanomaterial Case Study: Nanoscale Silver in Disinfectant Spray (Final Report) [Электронный ресурс] / U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/600/R-10/081F. – 2012. – Режим доступа: <http://www.epa.gov/ncea/nano>.

190. Van der Zande, M. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure / M. van der Zande, R.J. Vandebriel, D.E. Van, E. Kramer, R.Z. Herrera, C.S. Serrano-Rojero, E.R. Gremmer, J. Mast, R.J. Peters, P.C. Hollman, P.J. Hendriksen, H.J. Marvin, A.A. Peijnenburg, H. Bouwmeester // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, N 8. – P. 7427-7442.

191. Vasakova, M. Challenges of antituberculosis treatment in patients with difficult clinical conditions // Clin Respir J. – 2015. – Vol. 9. – P. 143-152.

192. Vlachou, E. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption / E. Vlachou, E. Chipp, E. Shale, Y.T. Wilson, R. Papini, N.S. Moiemmen // *Burns*. – 2007. – Vol. 33, N 8. – P. 979-985.

193. Vlasova, I.I. Peroxidase-induced degradation of single-walled carbon nanotubes: hypochlorite is a major oxidant capable of in vivo degradation of carbon nanotubes [Электронный ресурс] / I.I. Vlasova, T.V. Vakhrusheva, A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, A.A. Ragimov // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2011. – Vol. 291. – Режим доступа: <http://iopscience.iop.org/1742-6596/291/1/012056>.

194. Vyas, S.P. Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages / S.P. Vyas, M.E. Kannan, S. Jain, V. Mishra, P. Singh // *Int. J. Pharm.* – 2004. – Vol. 269, N 1. – P. 37-49.

195. WHO. Global Tuberculosis Report 2014 [Электронный ресурс] // Geneva: WHO Press. – 2014. – Режим доступа: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

196. Wiberg, E. Holleman Wiberg's Inorganic Chemistry / E. Wiberg, N. Wiberg, A.F. Holleman // San Diego, CA: Academic Press. – 2001. – 1924 p.

197. Wijnhoven, S.W.P. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment / S.W.P. Wijnhoven, W.J.G.M. Peijnenburg, C.A.A. Herberts, W.I. Hagens, A.G. Oomen, E.H.W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent, S. Dekkers, W.H. De Jong, M. Van Zijverden, A.J.A.M. Sips, R. Geertsma // *Nanotoxicology*. – 2009. – Vol. 3, N 2. – P. 109-138.

198. Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species / *Nat. Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 4, N 5. – P. 278-286.

199. Wu, C.H. Studies of the equilibrium and thermodynamics of the absorption of Cu^{2+} onto as-produced and modified carbon nanotubes // *J. Colloid. Interface Sci.* – 2007. – Vol. 311, N 2. – P. 338-346.

200. Yah, S.C. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures / S.C. Yah, S.G. Simate, E.S. Iyuke // *Pakistan J. Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 25, N 2. – P. 477-491.

201. Yang, C.N. Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes: length effect / C.N. Yang, J. Mamouni, Y.A. Tang, L.J. Yang // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26. – P. 16013-16019.

202. Yang, X. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans* / X. Yang, A.P. Gondikas, S.M. Marinakos, M. Auffan, J. Liu, H. Hsu-Kim, J.N. Meyer // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 46, N 2. – P. 1119-1127.

203. Yilma, A.N. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis* / A.N. Yilma, S.R. Singh, S. Dixit, V.A. Dennis // *International Journal of Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 2421-2432.

204. Zhang, L. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments / L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2008. – Vol. 83, N 5. – P. 761-769.

205. Zhang, R. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis / R. Zhang, M.J. Piao, K.C. Kim, A.D. Kim, J.Y. Choi, J. Choi, J.W. Hyun // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 44, N 1. – P. 224-232.

206. Zolnik, B.S. Minireview: Nanoparticles and the Immune System / B.S. Zolnik, A. Gonzalez-Fernandez, N. Sadrieh, M.A. Dobrovolskai // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151, N 2. – P. 458-465.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**а) статьи в рецензируемых научных журналах**

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.

б) тезисы докладов на научных конференциях

3. **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 Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, Россия, 2010.

4. **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, Московская обл., 2010. – С. 92-95.

5. 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.

6. 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. – Boston, MA, USA, 2011. – P. 209.

7. **Полежаева, О.В.** Применение метода проточной цитофлуориметрии 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.

8. **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.

9. **Калмантаева, О.В.** Изучение антимикробных свойств наночастиц серебра и их влияния на цитокиновый ответ Т-лимфоцитов мышей линии С57В1 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.

10. 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. – Нагоя, Япония, 2013. – P. 75.

Выражаю искреннюю благодарность

Научному руководителю моей кандидатской диссертации канд. биол. наук В.В. Фирстовой и научному консультанту моей кандидатской диссертации д-ру биол. наук В.Д. Потапову, осуществлявшим научное руководство и оказывавшим методическую помощь на всех этапах работы;

Всем членам Ученого совета, а также моим научным рецензентам за глубокую проработку моей диссертационной работы и ценные замечания;

Сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ В.Н. Герасимову, Е.А. Ганиной, Н.С. Грищенко, Т.И. Рудницкой, Т.И. Комбаровоу, Е.В. Зыриной, В.В. Перельгину, Г.М. Титаревой, И.В. Бахтеевой, Т.Б. Кравченко за помощь и содействие в работе;

ФБУН ГНЦ ПМБ, в лице директора чл.-корр. РАН, д-ра мед. наук, проф. И.А. Дятлова, за предоставленную возможность провести необходимые эксперименты и выполнить данную работу.