

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А
Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:
214019, г. Смоленск, а/я 5.

Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск, ул. Кирова 46А. www.iacmac.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск, ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи
Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 00.00.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук
Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (Микробиологическая лаборатория ЕКДЛ SmartLab АО «Группа компаний «МЕДСИ»)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2025.

Содержание

Болезни и возбудители

- Козлова И.В., Носов Н.Ю., Юнакова И.В., Плахова К.И., Кубанов А.А.
268 Генетическое разнообразие *Chlamydia trachomatis* на территории России
- Лебедева Е.О., Давтян Л.А., Кузнецова И.К., Шутов М.В., Рачина С.А.
275 Респираторно-синцитиальный вирус у взрослых: особенности течения и инновационные методы профилактики
- Ларин Е.С., Рачина С.А., Федина Л.В., Зайналабидова Х.Г., Агеев В.А., Сидоренко С.В., Авдеева А.А.
289 Инфекции, вызванные гипервирулентными изолятами *Klebsiella pneumoniae*: актуальность проблемы
- Арбузова Н.В., Шпилева М.В., Катунин Г.Л., Носов Н.Ю.
304 Протеомика *Treponema pallidum*: перспективы улучшения серологической диагностики сифилиса
- Кожушная О.С., Воропаев А.Д., Левин П.А., Новичкова Г.А., Солопова Г.Г.
309 Анализ мутаций резистентности цитомегаловируса и клинических особенностей течения ЦМВ-инфекции у иммунокомпрометированных детей

Антимикробные препараты

- Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Симончик М.В., Пыж А.Э., Голикова М.В.
317 Сравнительная активность меропенема и биопенема и их комбинаций с колистином в отношении грамотрицательных микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз различных групп
- Арепьева М.А., Кузьменков А.Ю., Старостенков А.А., Колбин А.С., Балыкина Ю.Е., Гомон Ю.М., Курылев А.А., Козлов Р.С.
330 Интегрированная система мониторинга потребления антимикробных препаратов и прогнозирования резистентности на основе динамических моделей

Антибиотикорезистентность

- Припутневич Т.В., Нечаева О.В., Бембеева Б.О., Гордеев А.Б., Кузнецова В.А., Скоробогатый А.В., Изюмов Р.В.
342 Изучение антибиотикорезистентности гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у пациентов перинатальных центров различных регионов Российской Федерации
- Фёдорова А.В., Хрульнова С.А., Фролова И.Н., Ветохина А.В., Молчанова И.В., Куцевалова О.Ю., Клясова Г.А.
359 Ванкомицинорезистентные *Enterococcus faecium* в гематологии: чувствительность к антимикробным препаратам и клональное разнообразие
- Гульятеева Н.А., Виноградова А.Г., Колесникова И.В., Рыжова К.А., Шелковникова О.В.
369 Опыт создания замкнутого цифрового контура для обеспечения непрерывного мониторинга антимикробной резистентности на основе валидированных результатов микробиологической диагностики

Опыт работы

- Рачеева Ю.В., Эйдельштейн И.А., Пунин А.А., Ветлицына О.В., Ашакевич Т.П., Романов А.В., Козлов Р.С.
390 Распространенность *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* у пациентов с обострением ХОБЛ в осенне-зимний период 2022–2023 гг. в Смоленской области
- Любимова Л.В., Павлова С.И., Любимов Е.А., Микишанина Е.А.
395 Динамика антибиотикорезистентности возбудителей перипротезной инфекции крупных суставов до и после пандемии COVID-19
- Казюлина А.А., Грачева А.Н., Токаев Т.К., Синецын М.В., Елисеев П.И., Тюлькова Т.Е., Загоскин Ю.Д., Григорьев Т.Е., Васильева И.А.
406 Оценка бактерицидного действия объемных пористых композиционных материалов, импрегнированных серебром, на *Mycobacterium tuberculosis*
- Данилов Д.И., Савочкина Ю.А., Эйдельштейн И.А., Адешкина Н.И., Олейник О.Н., Гордукова М.А., Шипулин Г.А.
417 Выявление устойчивых к макролидам *Mycoplasma pneumoniae* с помощью быстрых молекулярно-генетических методов: разработка и валидация диагностического ПЦР-теста

Оценка бактерицидного действия объемных пористых композиционных материалов, импрегнированных серебром, на *Mycobacterium tuberculosis*

Казюлина А.А.¹, Грачева А.Н.¹, Токаев Т.К.¹, Синицын М.В.¹, Елисеев П.И.¹, Тюлькова Т.Е.¹, Загоскин Ю.Д.^{1,2}, Григорьев Т.Е.², Васильева И.А.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Контактный адрес:

Татьяна Евгеньевна Тюлькова

Эл. почта: tulkova2006@rambler.ru

Ключевые слова: туберкулез, *M. tuberculosis*, наночастицы серебра, хитозановые импланты, антимикробная активность.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Определение антимикробной эффективности композиционного материала, импрегнированного серебром, в отношении *M. tuberculosis*.

Материалы и методы. В НИЦ «Курчатовский институт» были получены образцы внешней оболочки объемных пористых композиционных материалов с включенными в структуру антимикробными веществами (наночастицами серебра, а также серебра протеината). Всего было получено два типа образцов с различным содержанием частиц: «хитозан Ag» и «хитозан Ag2». Для получения внешней оболочки с импрегнированным в структуру комплексом протеината серебра из хитозана Primex 43040 с глутаровым альдегидом добавляли водный раствор протеината серебра с различными концентрациями («хитозан Пр» и «хитозан Пр2»). Контрольным был образец внешней оболочки без добавления препаратов. Для определения активности образцов композиционного материала, содержащих частицы серебра, использовали чистую культуру контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv. В пробирки вносились соответствующие образцы («хитозан Ag», «хитозан Ag2», «хитозан Пр» и «хитозан Пр2») и 100 мкл суспензии *M. tuberculosis* H37Rv. Длительность инкубирования составляла 28 дней или по достижению пробирки с контролем роста 400 ростовых единиц.

Результаты. Исследование проводилось на двух концентрациях протеината серебра – 20 и 40 мг/мл, импрегнированных в хитозановые импланты, и двух концентрациях наночастиц серебра. Во всех случаях присутствовала зона задержки роста (7 мм), вне зависимости от концентрации препарата, т.е. антимикробная активность была слабой. В пробирках с хитозановым имплантом без действующего вещества было зарегистрировано начало роста на 6-ые сутки, в пробирках с хитозановыми имплантами, импрегнированными протеинатом серебра – на 11-ые сутки, т.е. полного подавления роста культуры не отмечено. При высокой концентрации наночастиц серебра (0,034–0,042 нмоль/мл) наблюдалось полное ингибирование роста *M. tuberculosis* H37Rv, при низкой концентрации точка начала роста культуры – 16-ые сутки. На основании этого было высказано предположение о перспективности этой композиции. Пробирки с хитозановыми имплантами, импрегнированными наночастицами серебра в высокой концентрации (0,034–0,042 нмоль/мл), были оставлены в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 для оценки временного промежутка активности серебра в отношении *M. tuberculosis*. В ходе эксперимента положительный результат в виде роста культуры был зафиксирован на 35-ые сутки.

Выводы. В ходе исследования продемонстрирована антимикробная активность различных форм серебра. Для протеината серебра необходимо значительное увеличение концентрации импрегнации в импланты, что говорит о слабой антимикробной активности данного препарата, а наночастицы серебра в высокой концентрации (0,034–0,042 нмоль/мл) показывают бактерицидную активность в отношении *M. tuberculosis* complex, продолжающуюся в течение 35 суток.

Original Article

Assessment of bactericidal effect of volume-porous composite materials impregnated with silver on *Mycobacterium tuberculosis*

Kazyulina A.A.¹, Gracheva A.N.¹, Tokaev T.K.¹, Sinicyn M.V.¹, Eliseev P.I.¹, Tyulkova T.E.¹, Zagoskin Yu.D.^{1,2}, Grigoriev T.E.², Vasilyeva I.A.¹

¹ National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

Казюлина А.А. и соавт.

Contacts:
Anastasia V. Fedorova
E-mail: mirnas19@yandex.ru

Key words: tuberculosis,
M. tuberculosis, silver nanoparticles,
chitosan implants, antimycobacterial
activity.

Conflicts of interest: all authors report no
conflicts of interest relevant to this article.
External funding source: no external funding
received.

Objective. Determination of the antimycobacterial efficacy of a composite material impregnated with silver in relation to *M. tuberculosis*.

Materials and methods. Samples of the outer shell of bulk porous composite materials with antimycobacterial substances included in the structure (silver (Ag) nanoparticles, as well as silver proteinate) were obtained at the Kurchatov Institute. In total, two types of samples with different particle contents were obtained: chitosan Ag and chitosan Ag2. To obtain an outer shell with an impregnated silver proteinate complex from chitosan Primex 43040 with glutaraldehyde: an aqueous solution of silver proteinate with different concentrations («chitosan Pr» and «chitosan Pr2») was added. The control sample was the outer shell without the addition of drugs. To determine the activity of composite material samples containing silver particles, a pure culture of the control strain *M. tuberculosis* H37Rv was used. The corresponding samples («chitosan Ag», «chitosan Ag2», «chitosan Pr» and «chitosan Pr2») and 100 µl of *M. tuberculosis* H37Rv suspension were added to the test tubes. The incubation duration is 28 days or upon reaching a growth control tube of 400 growth units.

Results. The study was conducted on 2 concentrations of silver proteinate of 20 and 40 mg/ml, impregnated into chitosan implants and 2 concentrations of silver nanoparticles. In all cases, there was a growth retardation zone (7 mm), regardless of the concentration of the drug, i.e. antimycobacterial activity was weak. In tubes with chitosan implants without the active substance, the onset of growth was recorded on the 6th day, in tubes with chitosan implants impregnated with silver proteinate – on the 11th day, i.e. there is no complete suppression of culture growth. At high concentrations of silver nanoparticles (0.034–0.042 nmol/ml), complete inhibition of the growth of *M. tuberculosis* H37Rv was observed; at low concentrations, the culture growth point was on day 16. This composition is promising. Tubes with chitosan implants impregnated with silver nanoparticles in high concentration (0.034–0.042 nmol/ml) were left in the automated Bactec MGIT 960 system to assess the time interval of silver activity against *M. tuberculosis*, a positive result was recorded on the 35th day.

Conclusions. The study demonstrated antimycobacterial activity of various forms of silver. Silver proteinate requires a significant increase in concentration of impregnation in implants, which indicates a weak antimycobacterial activity of this drug, and silver nanoparticles at high concentrations (0.034–0.042 nmol/ml) show bactericidal activity against *M. tuberculosis* complex, lasting for 35 days.

Введение

Туберкулез (ТБ) нередко сопровождается значительной деструкцией легочной ткани с образованием полостей, которые зачастую требуют хирургического лечения. Распространение ТБ с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ) создает дополнительные предпосылки к более широкому применению хирургических методов лечения [1], а также необходимости поиска новых подходов для предотвращения осложнений после хирургического вмешательства. Ряд авторов демонстрируют, что ранняя резекция легкого в сочетании с химиотерапией обеспечивает более высокие показатели сохранения легочной паренхимы и рассматривается как неотъемлемый компонент лечения лекарственно-устойчивого (ЛУ) ТБ [2]. По данным литературы, эффективность лечения ЛУ ТБ с использованием хирургического этапа достигает 91,4%, в том числе после резекции – 96,6%, пульмонэктомии – 84,6%, торакопластики – 85,7% [3].

Внедрение в повседневную терапевтическую практику современных биотехнологических методов является одной из актуальных задач биомедицины. Одной из важных проблем торакальной хирургии является разработка биорезорбируемого пористого материала [4] для интра- или экстраплевральной имплантации и формирования *in situ* «биологической пломбы» как аль-

тернативного метода коррекции объема плевральной полости при хирургических вмешательствах на легких [5]. Эффективность данного подхода может быть повышена путем импрегнации антибактериальных препаратов, оказывающих направленное антимикробное воздействие. Предлагается насыщать имплантаты из полилактида/поликапролактона (PLA/PCL) для обеспечения лучшего высвобождения противотуберкулезных препаратов (ПТП), в том числе обеспечивая создание необходимой концентрации лекарственного препарата в прилежащих структурах [6]. Немаловажное значение имеет пористость носителя, обеспечивающая способность к непрерывному высвобождению лекарственного средства [7]. Наряду с возможностью импрегнации имплантатов ПТП, идут поиски новых субстанций, обеспечивающих повышение эффективности лечения за счет антимикобактериального действия, иммунологической активации и возможности клеточной регенерации в легочной паренхиме. В исследованиях была продемонстрирована активность различных форм серебра в отношении *Mycobacterium tuberculosis* [8]. В данном случае открывает значительные перспективы импрегнация наночастицами серебра за счет возможности комбинации с ПТП или классическими антибактериальными препаратами для взаимного потенцирования

бактерицидного эффекта [9]. Препараты, содержащие серебро в различной форме, находят применение в медицине как агенты с выраженными бактерицидными свойствами. Чаще всего в медицине применяются протеинаты серебра или стабилизированное различными поверхностно-активными веществами коллоидное серебро [10]. В частности, хорошо изучен антибактериальный и антисептический эффект протаргола – серебросодержащего белкового соединения, обладающего, в том числе, противовоспалительными свойствами [11]. В настоящее время в условиях непрерывного роста потребления антибиотиков и «кризиса антибиотикорезистентности» серебро в форме наночастиц или в комбинации с классическими антибиотиками всё чаще рассматривается в качестве потенциального антимикробного препарата [12]. Недавние исследования показали, что наночастицы серебра проявляют антимикробактериальную активность [13, 14]. Таким образом, исследование новой концепции антимикробактериальных наночастиц может изменить современные взгляды на терапию ТБ.

Цель исследования – определить антимикробактериальную эффективность композиционного материала, импрегнированного серебром, в отношении *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

Приготовление образцов композиционного материала, содержащих частицы серебра в различных формах и концентрациях, для проведения микробиологических испытаний

В НИЦ «Курчатовский институт» были получены образцы внешней оболочки объемных пористых композиционных материалов с включенными в структуру антимикробактериальными веществами. В качестве таких соединений выступали *in situ* восстановленные наночастицы серебра, а также лекарственный препарат серебра протеинат.

Для *in situ* получения наночастиц серебра была выбрана методика с использованием раствора хитозана. При добавлении AgNO_3 в хитозановый раствор начинается процесс восстановления серебра хитозаном



Рисунок 1. Внешний вид заготовок оболочки объемных пористых композиционных каркасов с включенными в структуру антимикробактериальными веществами

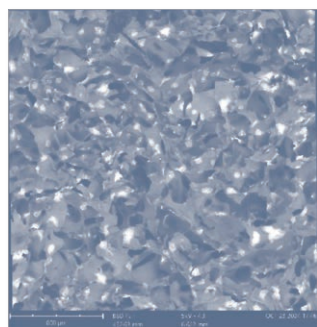
Слева направо: «хитозан Ag» (исходный раствор, содержащий частицы Ag, был разбавлен в 2 раза), «хитозан Ag2» (исходный раствор, содержащий частицы Ag, без разбавления), «хитозан Пр» (добавляли 3 мл водного раствора протеината серебра с концентрацией 66,7 мг/мл), «хитозан Пр2» (добавляли 3 мл водного раствора протеината серебра с концентрацией 133,3 мг/мл), контроль.

[15–17]. Для реализации данного метода получали 1% раствор хитозана с 1,04% AgNO_3 в 2% уксусной кислоте и термостатировали при 60°C в течение 5 суток. В качестве хитозана использовали Primex 43000 и AgNO_3 (РеаХим 99,95 ГОСТ 1277-63). В результате в растворе были получены наночастицы серебра преимущественно сферической формы с преобладающей фракцией с характерным размером порядка 2–20 нм и некоторое число агрегатов серебра с характерным размером порядка 25–200 нм. Это было установлено методом просвечивающей электронной микроскопии. Наночастицы были стабилизированы оболочкой из полисахарида. Концентрация частиц в полученном растворе не превышала 140 нмоль/л, однако на данный момент точное определение концентрации частиц в растворе затруднено.

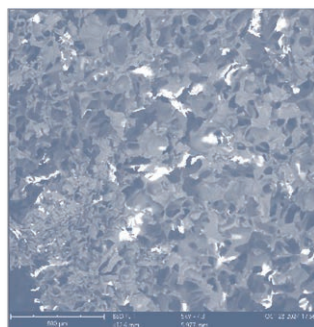
Для формирования оболочки (хитозан Primex 43040) к 6 мл 3% раствора хитозана в 1% уксусной кислоте добавляли 1 мл глутарового альдегида с концентрацией 1%, затем прибавляли 3 мл ранее полученного

Таблица 1. Описание образцов композиционных имплантов, использованных в работе

№	Название образца	Лабораторное обозначение	Состав внешней оболочки (аэрогеля) в расчете на объем материала
1	Хитозан Ag	ChitAg	Хитозан 2 об. % (глутаровый альдегид 1 мас. % от сухого остатка хитозана) / наночастицы серебра 0,017–0,021 нмоль/мл
2	Хитозан Ag2	ChitAg2	Хитозан 2 об. % (глутаровый альдегид 1 мас. % от сухого остатка хитозана) / наночастицы серебра 0,034–0,042 нмоль/мл
3	Хитозан Пр	ChitPr	Хитозан 2 об. % (глутаровый альдегид 1 мас. % от сухого остатка хитозана) / протеинат серебра 20 мг/мл
4	Хитозан Пр2	ChitPr2	Хитозан 2 об. % (глутаровый альдегид 1 мас. % от сухого остатка хитозана) / протеинат серебра 40 мг/мл
5	Хитозан контроль	Chit-K	Хитозан 2 об. % (глутаровый альдегид 1 мас. % от сухого остатка хитозана)



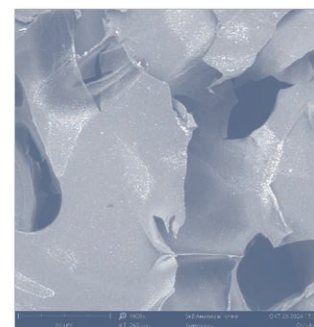
Хитозан Ag



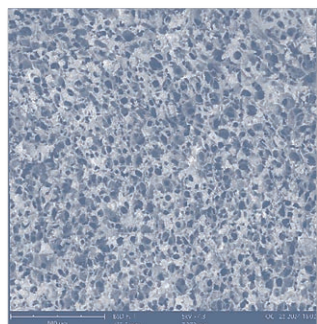
Хитозан Ag2



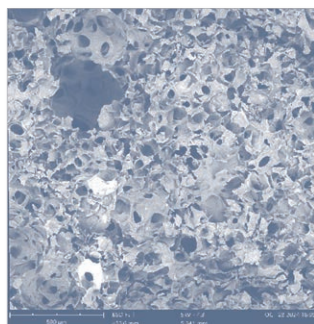
Хитозан Ag



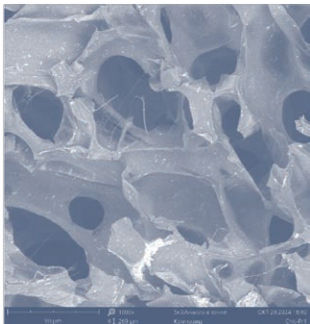
Хитозан Ag2



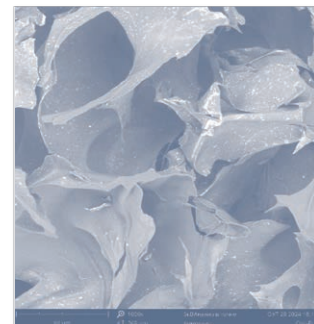
Хитозан Пр



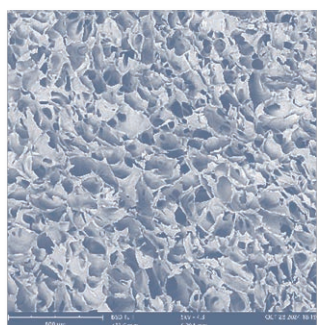
Хитозан Пр2



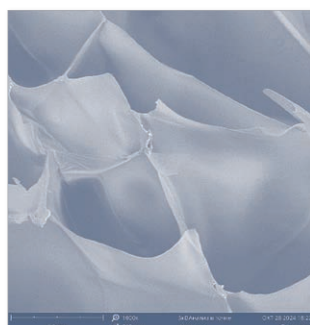
Хитозан Пр



Хитозан Пр2



Хитозан контроль



Хитозан контроль

Рисунок 2. Микрофотографии срезов губчатых материалов с различными антимикробактериальными препаратами

Рисунок 3. Микрофотографии срезов губчатых материалов с различными антимикробактериальными препаратами при большем увеличении

раствора с *in situ* восстановленными наночастицами серебра. Всего было получено два типа образцов с различным содержанием частиц: «хитозан Ag» и «хитозан Ag2». В первом случае исходный раствор, содержащий частицы, был разбавлен в 2 раза. Для получения «хитозан Ag2» раствор с наночастицами добавляли без разбавления.

Для получения внешней оболочки с импрегнированным в структуру комплексом протеината серебра использовали, как и в случае предыдущих материалов, хитозан Primex 43040 с глутаровым альдегидом. На стадии получения материалов добавляли 3 мл водного раствора протеината серебра с концентрациями

66,7 мг/мл и 133,3 мг/мл («хитозан Пр» и «хитозан Пр2»). В качестве контроля был использован образец внешней оболочки без добавления антибактериальных препаратов. Внешний вид всех образцов представлен на Рисунке 1, состав образцов представлен в Таблице 1.

Морфология полученных материалов была изучена методом растровой электронной микроскопии. При небольшом увеличении видно, что пористая структура сохраняется для всех типов материалов (Рисунок 2). При большем увеличении видно, что для всех материалов с включенными препаратами наблюдаются микронные агрегаты соответствующих соединений/частиц на поверхности стенок губок (Рисунок 3).

Определение антимикобактериальной активности образцов композиционного материала, содержащих частицы серебра, методом диффузии в агар и модифицированным методом пропорций в жидкой среде Middlebrook 7H9

Для определения активности образцов композиционного материала, содержащих частицы серебра, использовали чистую культуру контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительного ко всем ПТП. После получения свежей культуры *M. tuberculosis* H37Rv готовили суспензию в 0,9% растворе хлорида натрия согласно стандарту мутности по МакФарланду 0,5 ед. (1×10^7 КОЕ/мл [18, 19]).

Для определения антимикробной активности методом диффузии в агар в чашки Петри разливали фиксированное количество агаровой питательной среды (Middlebrook 7H11, 25 мл). После застывания агара 100 мкл суспензии *M. tuberculosis* H37Rv засеивали «сплошным газоном», обеспечивая равномерное распределение с помощью шпателя Дрегалевского. Далее на поверхность агара помещали исследуемые образцы композиционного материала, содержащие частицы серебра, и инкубировали в термостате при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$ продолжительностью не менее 14 дней. Чашки просматривались еженедельно до появления видимого роста, и при формировании газона проводили учет результатов – измерение диаметров зон задержки роста.

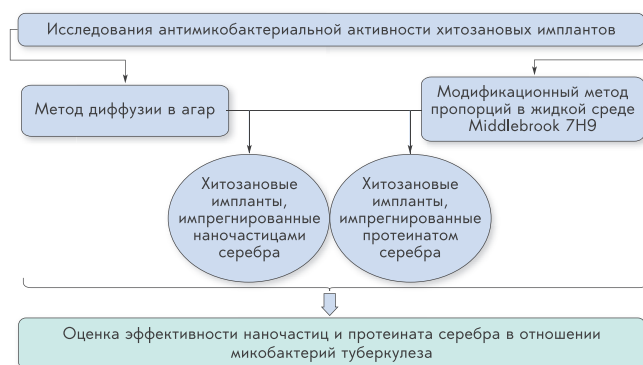
Помимо чашек с композиционным материалом, ставились контроли:

- отрицательный контроль (контаминационный контроль условий засева): чашка Петри с плотной агаровой средой Middlebrook 7H9 без культуры *M. tuberculosis* H37Rv;
- положительный контроль роста – чашка Петри с контролем роста штамма *M. tuberculosis* H37Rv;
- контроль отсутствия антибактериальной активности хитозана: в чашку с контрольным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv помещался хитозановый образец композиционного материала без действующего вещества (наночастиц серебра или протеината серебра).

При изучении антибактериальной активности модифицированным методом пропорций образцы композиционного материала инкубировали с помощью ав-

томатизированной системы BACTEC MGIT (BD, США), используя специализированные пробирки, содержащие 10 мл жидкой питательной среды Middlebrook (Bactec MGIT Growth Indicator Tubes, BD, США) и ростовую добавку в объеме 750 мкл (Middlebrook OADC Enrichment, BD, США). В пробирки вносились соответствующие образцы («хитозан Ag2», «хитозан Пр» и «хитозан Пр2») и 100 мкл суспензии *M. tuberculosis* H37Rv, соответствующей стандарту мутности 0,5 ед. (1×10^7 КОЕ/мл). Положительным контролем служил рост контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv без исследуемых образцов композиционного материала; отрицательным – пробирка без контрольного штамма (контаминационный контроль условий засева) и пробирка с образцом композиционного материала без действующего вещества (контроль отсутствия подавления роста хитозаном). Длительность инкубирования составляла 28 дней или, согласно инструкции, по достижению пробирки с контролем роста 400 ростовых единиц.

Дизайн исследования:



Результаты

Результаты исследования методом диффузии в агар Middlebrook 7H9

При проведении оценки полученных результатов предварительно необходимо убедиться в качестве проведенного эксперимента с помощью оценки прохожде-

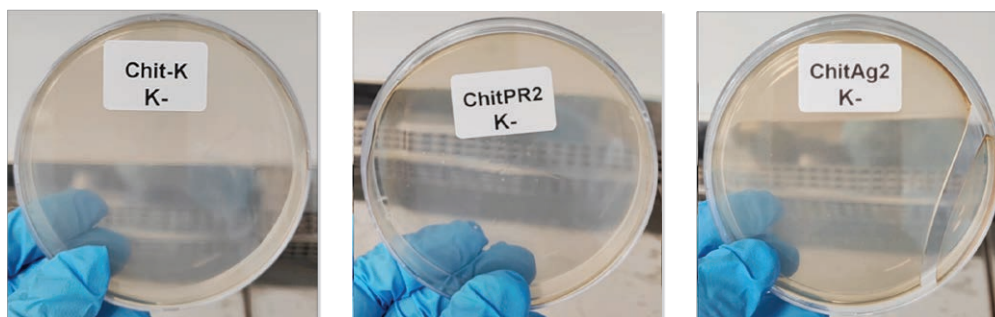


Рисунок 4. Примеры полученных чашек с отрицательным контролем роста



Рисунок 5. Примеры полученных чашек с положительным контролем роста

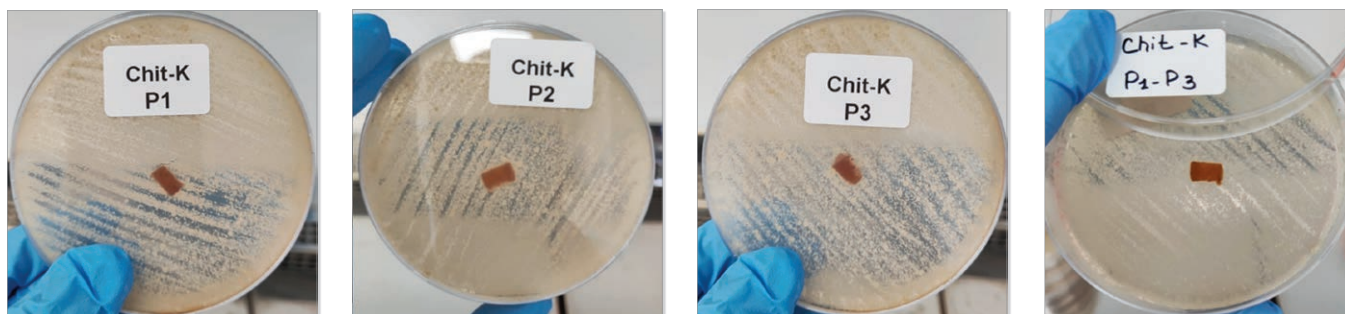


Рисунок 6. Примеры полученных чашек с контролем подавления роста хитозана

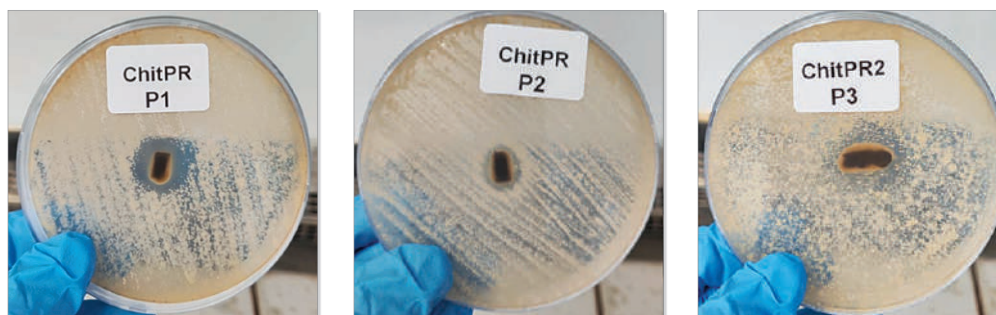


Рисунок 7. Результаты исследования активности хитозановых имплантов, импрегнированных протеином серебра в концентрации 20 мг/мл

ния контролей. Контаминационный контроль условий засева проводился методом визуальной оценки отсутствия роста на чашках с отрицательным контролем роста. Во всех отрицательных контролях не было получено роста контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что свидетельствует о прохождении контроля асептических условий при посеве. Примеры полученных результатов представлены на Рисунке 4.

Оценка роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv проводилась на чашках с положительным контролем роста методом визуальной оценки. Оценивалось наличие роста культуры, а также равномерности роста микобактериального монослоя. Во всех контрольных чашках наблюдался равномерный рост контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что свидетельствует о прохожде-

нии положительного контроля реакции. Примеры полученных результатов представлены на Рисунке 5.

Оценка контроля отсутствия подавления роста хитозаном проводилась визуальным методом на чашках, в которых присутствовал хитозан без добавления исследуемого вещества (наночастиц серебра или протеината серебра). Успешное прохождение данного контроля свидетельствует об отсутствии влияния хитозана на микобактериальную культуру, как носителя активного вещества (наночастиц серебра или протеината серебра). Полученные результаты отражены на Рисунке 6. На всех чашках с хитозановым имплантом без импрегнации наночастицами серебра или протеинатом серебра наблюдался рост колоний штамма *M. tuberculosis* H37Rv равномерным слоем, что свиде-

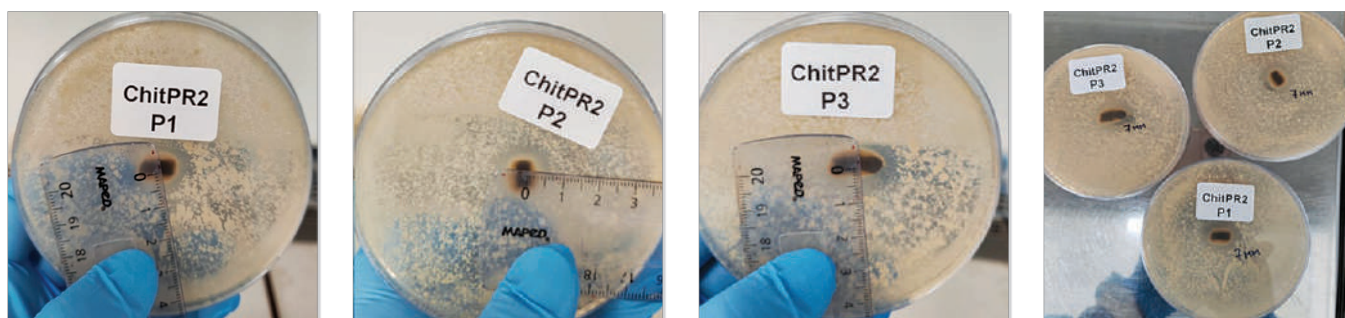


Рисунок 8. Результаты исследования активности хитозановых имплантов, импрегнированных протеинатом серебра в концентрации 40 мг/мл

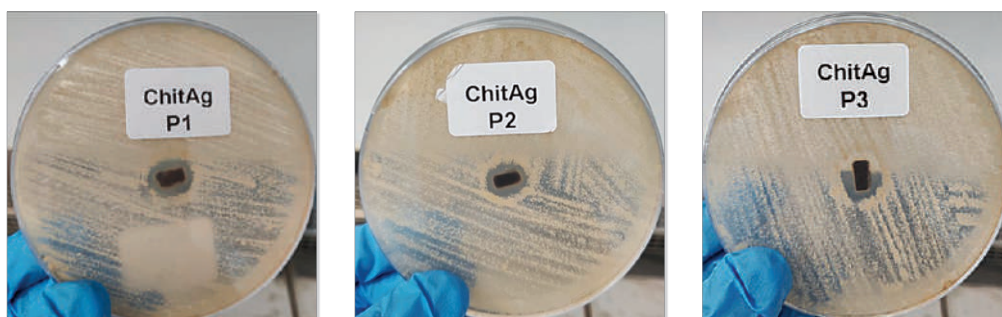


Рисунок 9. Результаты исследования активности хитозановых имплантов, импрегнированных наночастицами серебра в концентрации 0,017–0,021 нмоль/мл

тельствует об успешном прохождении контроля подавления роста хитозаном.

При совокупной оценке результатов прохождения контролей посева было выявлено отсутствие влияния хитозана на рост *M. tuberculosis* H37Rv, а также прохождение контролей реакции, что свидетельствует о достоверности полученных результатов эксперимента.

Оценка результатов исследования антимикробактериальной активности хитозановых имплантов, импрегнированных протеинатом серебра

Исследование проводилось на двух концентрациях протеината серебра (20 и 40 мг/мл), импрегнированного в хитозановые импланты. С целью исключения

«случайных» результатов, эксперимент проводился в трех повторах для каждой концентрации. Во всех случаях присутствовала зона задержки роста (7 мм), вне зависимости от концентрации препарата (Рисунки 7 и 8). Это свидетельствует о наличии слабой антимикробактериальной активности протеината серебра в отношении *M. tuberculosis*.

Оценка результатов исследования антимикробактериальной активности хитозановых имплантов, импрегнированных наночастицами серебра

Исследование проводилось на двух концентрациях наночастиц серебра (0,017–0,021 и 0,034–0,042 нмоль/мл), импрегнированных в хитозановые

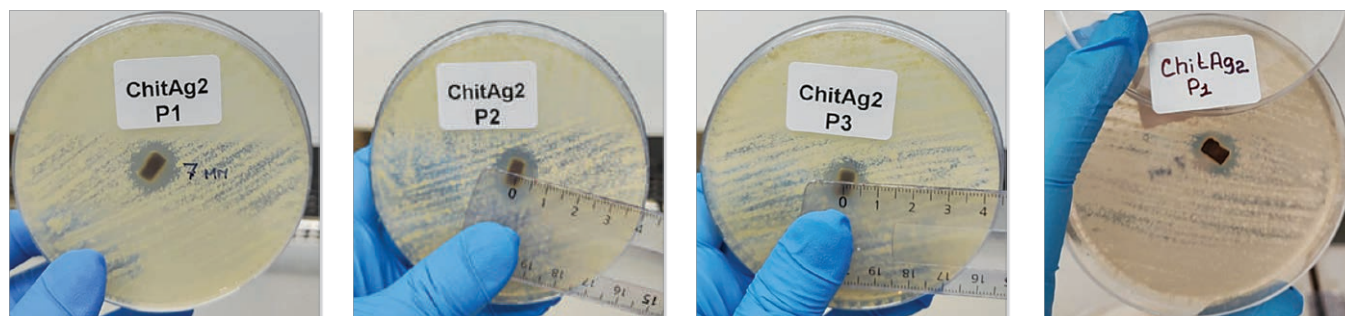


Рисунок 10. Результаты исследования активности хитозановых имплантов, импрегнированных наночастицами серебра в концентрации 0,034–0,042 нмоль/мл

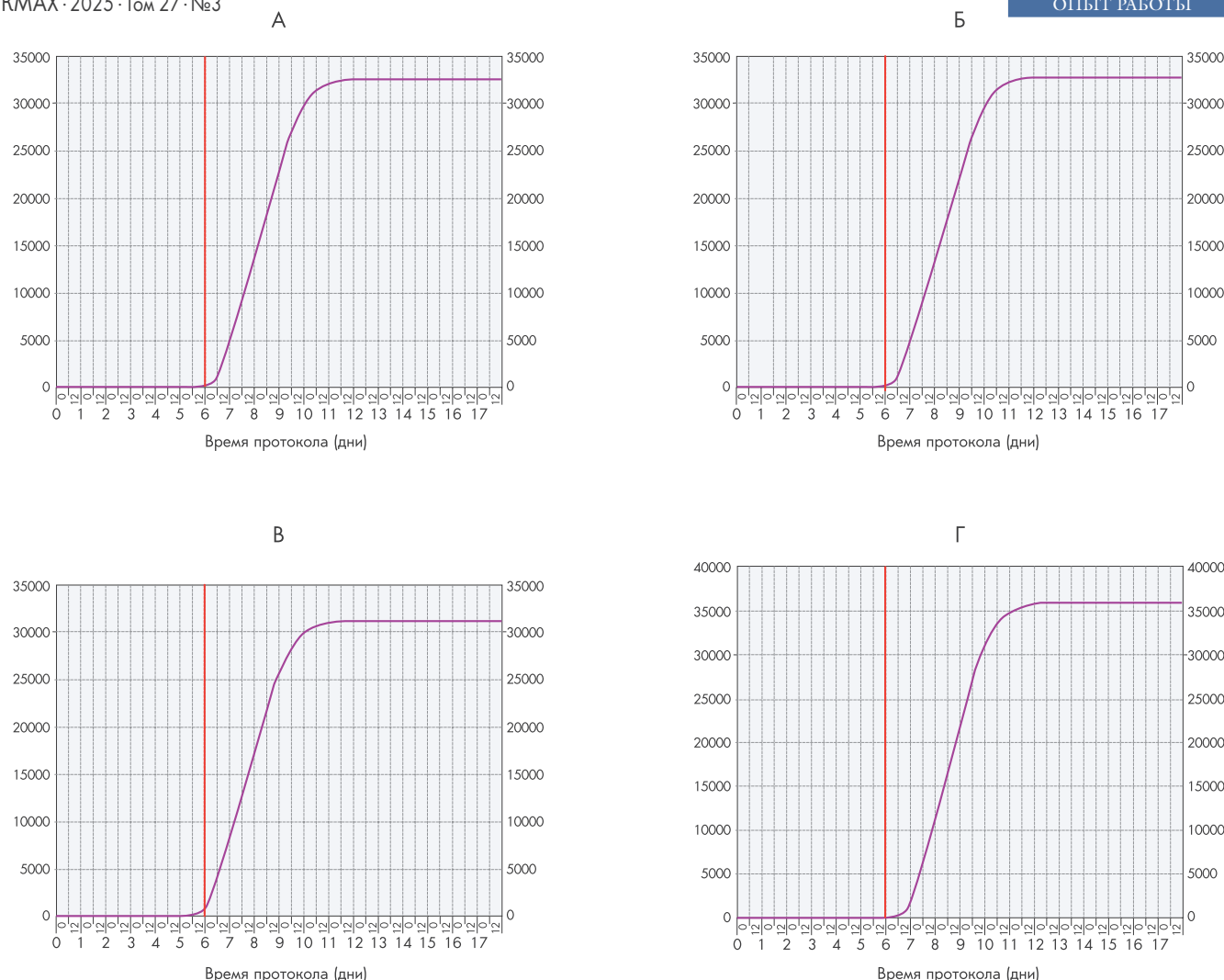


Рисунок 11. Графики роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv в пробирках контроля отсутствия подавления роста хитозаном

импланты. С целью исключения «случайных» результатов, эксперимент проводился в трех повторах для каждой концентрации. Выявлена зона задержки роста (7 мм), вне зависимости от концентрации препарата (Рисунки 9 и 10). Это свидетельствует о наличии слабой антимикобактериальной активности наночастиц серебра в отношении *M. tuberculosis*. Однако, стоит отметить, что зоны задержки роста у имплантов с наночастицами серебра были с более ярко-выраженными границами и контурами, в отличие от хитозановых имплантов с протеинатом серебра.

Результаты исследования модифицированным методом пропорций в жидкой среде Middlebrook 7H9 с помощью автоматизированной системы BACTEC MGIT

После достижения в пробирке с положительным контролем роста 400 ростовых единиц регистрировались результаты эксперимента. В пробирках с хитозановым имплантом без действующего вещества (контроль отсутствия подавления роста хитозаном) было зарегистрировано начало роста на 6-е сутки (Рисунок 11).

В пробирках с хитозановыми имплантами, импрегнированными протеинатом серебра, вне зависимости от концентрации препарата начало роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv было зафиксировано на 11-е сутки (Рисунок 12). Это говорит о низкой антимикобактериальной активности протеината серебра в отношении *M. tuberculosis*, т.к. полного подавления роста культуры не происходит.

Более обнадеживающие результаты получены для хитозановых имплантов, импрегнированных наночастицами серебра. При высокой концентрации наночастиц серебра (0,034–0,042 нмоль/мл) наблюдалось полное ингибирование роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv, тогда как при низкой концентрации (0,017–0,021 нмоль/мл) точка начала роста культуры была зафиксирована на 16-е сутки (Рисунок 13). Это говорит о перспективности применения данной композиции для изготовления имплантатов легких, обладающих антимикробным действием в отношении *M. tuberculosis* complex.

Дополнительно пробирки с хитозановыми имплантами, импрегнированными наночастицами серебра в

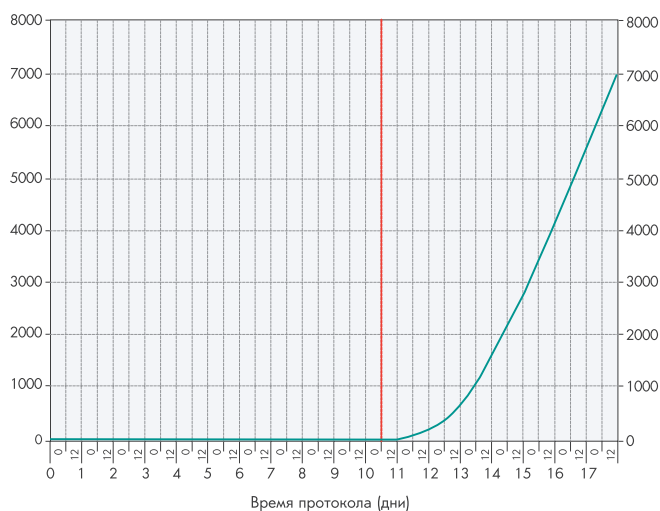


Рисунок 12. График роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv в пробирках с хитозановыми имплантатами, импрегнированными протеином серебра

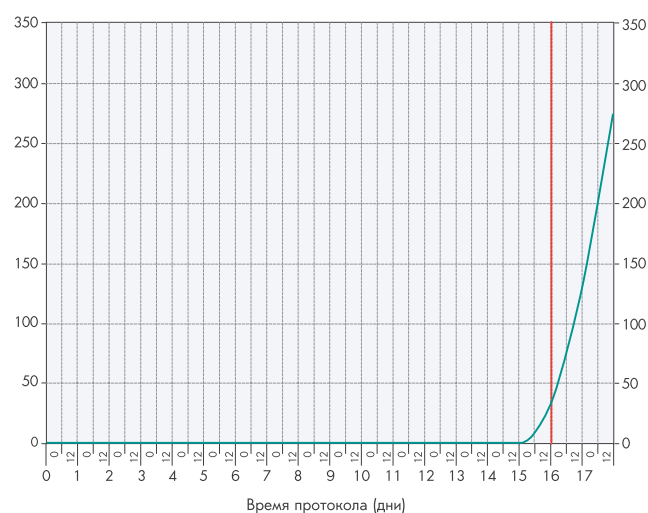


Рисунок 13. График роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv в пробирках с хитозановыми имплантатами, импрегнированными серебром в концентрации 0,017–0,021 нмоль/мл

высокой концентрации (0,034–0,042 нмоль/мл), были оставлены в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 для оценки временного промежутка активности серебра в отношении *M. tuberculosis*. На 35-е сутки данные пробирки были зафиксированы как положительные (т.е. количество ростовых единиц составило 100 и более). Таким образом, косвенно можно сказать о постепенной элюции серебра из хитозанового имплантата, однако этот факт требует более тщательного изучения и подтверждения другими методами.

Обсуждение

Импланты, используемые при хирургическом лечении ТБ, могут оказывать не только коллапсохирургический эффект, но и нести функцию доставки антимикробных препаратов к очагу инфекции для локальной терапии. Кроме ПТП, бактерицидное действие на *M. tuberculosis* обнаружено у препаратов серебра [8]. В ходе исследования этот эффект научно доказан в эксперименте, где оценивался рост контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и равномерность микобактериального монослоя в чашках с хитозаном с добавлением наночастиц или протеината серебра и без такового. В контроле отмечен равномерный рост *M. tuberculosis* H37Rv, что подтвердило отсутствие противотуберкулезного действия хитозана и позволило в эксперименте оценить его роль как носителя активного вещества (наночастиц серебра или протеината серебра) к очагу инфекции. В ходе исследования зафиксирована зона задержки роста (7 мм) вокруг имплантов из хитозана, импрегнированного протеином серебра в концентрации 20 и 40 мг/мл и наночастицами серебра (0,017–0,021 и 0,034–0,042 нмоль/мл), что позволило говорить о незначительной активности этих веществ в

отношении *M. tuberculosis*. Однако отмечено, что зона задержки роста у имплантов с наночастицами серебра имела более ярко-выраженную границу и четкий контур. Этот факт требовал объяснения. В связи с этим оценили время появления роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv вокруг имплантата без действующих веществ и при их наличии. Отмечено, что рост культуры вокруг свободного хитозана зарегистрирован на 6-е сутки, при импрегнации протеином серебра, вне зависимости от концентрации препарата, на 11-е сутки, а при использовании в качестве активного вещества наночастиц серебра в концентрации 0,034–0,042 нмоль/мл на 16-е сутки. Это могло свидетельствовать о перспективности применения наночастиц серебра в высокой концентрации (0,034–0,042 нмоль/мл) для импрегнации ими хитозанового имплантата. Последующая оценка временного промежутка элюции из имплантата наночастиц серебра продемонстрировала их активность до 35-го дня. В системе BACTEC зафиксирован положительный результат (т.е. количество ростовых единиц *M. tuberculosis* H37Rv составило 100 и более) на 35-е сутки. Таким образом, результаты косвенно подтверждают элюцию наночастиц серебра из хитозанового имплантата в течении 35 суток, обуславливая задержку роста возбудителя. Это может быть использовано в клинической практике в послеоперационном периоде не только для профилактики периимплантной инфекции, вызванной неспецифической флорой, но и местной терапии туберкулезной инфекции одновременно с проведением химиотерапии.

Заключение

В ходе исследования продемонстрирована незначительная антимикобактериальная активность различных форм серебра. При совокупности оценки эффек-

тивности наночастиц серебра и протеината серебра различными методами наблюдается подавление роста культуры микобактерий. Если для протеината серебра необходимо значительное увеличение концентрации препарата для импрегнации в имплантаты из-за его слабой антимикобактериальной активности, то наночастицы серебра в высокой концентрации

(0,034–0,042 нмоль/мл) показывают задержку роста *M. tuberculosis* complex (полное подавление роста контрольного штамма), продолжающуюся в течение 35 суток. Результаты, полученные обоими методами, говорят о перспективности применения хитозановых имплантов, импрегнированных как наночастицами серебра, так и протеинатом серебра.

Литература

1. Reykhurd M.V., Krasnov D.V., Krasnov V.A., Grishchenko N.G., Petrenko T.I. Delayed outcomes of surgical treatment of pulmonary tuberculosis patients residing in the region with high prevalence of the disease. *Tuberculosis and lung diseases*. 2017;95(2):13-15. Russian. (Рейхруд М.В., Краснов Д.В., Краснов В.А., Грищенко Н.Г., Петренко Т.И. Отдаленные результаты хирургического лечения больных туберкулезом легких, проживающих в регионе с высокой распространенностью заболевания. *Туберкулез и болезни легких*. 2017;95(2):13-15.) DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-2-13-15
2. Kang M.W., Kim H.K., Choi Y.S., Kim K., Shim Y.M., Koh W.J., Kim J. Surgical treatment for multidrug-resistant and extensive drug-resistant tuberculosis. *Ann Thorac Surg*. 2010;89(5):1597-1602. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2010.02.020
3. Zetov A.Sh., Erimbetov K.D. Surgical treatment of drug-resistant tuberculosis (review). *Bulletin of the AGIUM*. 2016;3. Russian. (Зетов А.Ш., Еримбетов К.Д. Хирургическое лечение лекарственно-устойчивого туберкулеза (обзор). *Вестник АГИУВ*. 2016;3.)
4. Tokaev K.V., Vasilieva I.A., Zyuzya Ju.R., Grigoriev T.E., Tokaev T.K., Tokaev V.K., et al. Investigation of bioresorbable porous implants based on polylactide and polycaprolactone. *Eur Respir J*. 2020;56(Suppl. 64):3136. DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.3136
5. Lukanina K.I., Zagoskin Yu.D., Vasil'eva I.A. Study of the properties of bioresorbable porous materials based on mixtures of polycaprolactone and polylactide. *Polymers in the strategy of scientific and technological development of the Russian Federation «Polymers-2020»*: Collection of abstracts of the Eighth All-Russian Karginy Conference, Moscow, November 9-13, 2020. Moscow: Limited Liability Company «MESOL», 2020. p. 312. Russian. (Луканина К.И., Загоскин Ю.Д., Васильева И.А. Исследования функциональных свойств биорезорбируемых пористых материалов на основе смеси поликапролактона и полилактида. *Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ «Полимеры-2020»*: Сборник тезисов Восьмой Всероссийской Каргинской конференции, Москва, 09-13 ноября 2020 г. Москва: Общество с ограниченной ответственностью «МЕСОЛ», 2020. с. 312.)
6. Athans V., Veve M.P., Davis S.L. Trowels and tribulations: review of antimicrobial-impregnated bone cements in prosthetic joint surgery. *Pharmacotherapy*. 2017;37(12):1565-1577. DOI: 10.1002/phar.2040
7. Miller R., McLaren A., Leon C., McLemore R. Mixing method affects elution and strength of high-dose ALBC: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2012;470(10):2677-2683. DOI: 10.1007/s11999-012-2351-2
8. Tăbăran A.F., Matea C.T., Mocan T., Tăbăran A., Mihaie M., Iancu C., Mocan L. Silver nanoparticles for the therapy of tuberculosis. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2231-2258. DOI: 10.2147/IJN.S241183
9. Poste G., Kirsh R. Site-specific (targeted) drug delivery in cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 1983;1:869-878. DOI: 10.1038/nbt1283-869
10. Krotikova O.A., Ozerin A.S., Radchenko F.S., Kolotova O.V. Composites based on polyethyleneimine and nanosized particles of silver iodide with antibacterial properties. *Bulletin of the Volgograd State Technical University*. 2017;3:45-49. Russian. (Кротикина О.А., Озерин А.С., Радченко Ф.С., Колотова О.В. Композиты на основе полиэтиленимина и наноразмерных частиц йодида серебра с антибактериальными свойствами. *Известия Волгоградского государственного технического университета*. 2017;3:45-49.) DOI: 10.19163/MedChemRussia2021-2021-430
11. Sichinava I.V. Protargol in the treatment of rhinosinuitis in children. *Russian medical journal*. 2015;14:844-846. Russian. (Сичинава И.В. Протаргол в лечении риносинусита у детей. *РМЖ*. 2015;14:844-846.)
12. Shanmuganathan R., Karuppusamy I., Saravanan M., Muthukumar H., Ponnuchamy K., Ramkumar V.S., Pugazhendhi A. Synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications – a comprehensive review. *Curr Pharm Des*. 2019;25(24):2650-2660. DOI: 10.2174/1381612825666190708185506
13. Montelongo-Peralta L.Z., León-Buitimea A., Palma-Nicolás J.P., Gonzalez-Christen J., Morones-Ramírez J.R. Antibacterial activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2019;9(1):5471. DOI: 10.1038/s41598-019-42049-5
14. Mohanty S., Jena P., Mehta R., Pati R., Banerjee B., Patil S.,

- Sonawane A. Cationic antimicrobial peptides and biogenic silver nanoparticles kill mycobacteria without eliciting DNA damage and cytotoxicity in mouse macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(8):3688-3698. DOI: 10.1128/aac.02475-12
15. Carapeto A.P., Ferraria A.M., Botelho do Rego A.M. Unraveling the reaction mechanism of silver ions reduction by chitosan from so far neglected spectroscopic features. *Carbohydr Polym.* 2017;174:601-609. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.100
 16. Yin Y., Li Z.-Y., Zhong Z., Gates B., Xia Y., Venkateswaran S. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *J Mat Chem.* 2002;12:522-527. DOI: 10.1039/b107469e
 17. Qin C.Q., Du Y.M., Xiao L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polym Degrad Stab.* 2002;76(2):211-218. DOI: 10.1016/S0141-3910(02)00016-2
 18. Choudhary A., Jain P., Mohapatra S., Mustafa G., Ansari M.J., Aldawsari M.F., et al. A novel approach of targeting linezolid nanoemulsion for the management of lymph node tuberculosis. *ACS Omega.* 2022;7(18):15688-15694. DOI: 10.1021/acsomega.2c00592
 19. Fujita M., Spray D.C., Choi H., Saez J.C., Watanabe T., Rosenberg L.C., et al. Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology.* 1987;7(Suppl. 1):1S-9S. DOI: 10.1083/jcb.105.1.541