

## НАНОЧАСТИЦЫ МЕТАЛЛИЧЕСКОГО СЕРЕБРА Ag(0) ВЫЗЫВАЮТ АПОПТОЗ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ, *IN VITRO* ИНФИЦИРОВАННЫХ МИКОБАКТЕРИЯМИ ВАКЦИНЫ БЦЖ, БЕЗ ИНДУКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЦИТОПЛАЗМЕ И МИТОХОНДРИЯХ

Е.Г. Уфимцева

НИИ биохимии, Новосибирск, e-mail: ufim1@ngs.ru

Туберкулез (ТБ), вызываемый внутриклеточным макрофагальным патогеном *Mycobacterium tuberculosis*, остается одной из значимых проблем здравоохранения. Отрицательной тенденцией последних лет в мире стало прогрессирующее увеличение числа случаев первичного заражения антибиотико-устойчивыми штаммами *M. tuberculosis* с развитием остро-прогрессирующих форм лекарственно-резистентного ТБ с тяжелым клиническим течением и значительной распространенностью патологического процесса. Все более широкое распространение штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам ставит в качестве актуальной задачи поиск новых способов и подходов как для подавления инфекции, так и для сокращения сроков лечения ТБ без снижения его эффективности. Одним из перспективных вариантов может быть применение препаратов наночастиц серебра, проявляющих высокую селективную бактерицидную активность в отношении прокариот (Rudramurthy et al., 2016; Wang et al., 2017).

Человек заражается *M. tuberculosis* в результате аэрозольной инфекции. Макрофаги легких захватывают микобактерии путем фагоцитоза и уничтожают их в фаголизосомах с помощью активных форм кислорода и азота, лизосомальных гидролаз и токсических пептидов в среде с низким значением рН. В основе развития туберкулезного заболевания лежит, как правило, неспособность макрофагов разрушать поглощенные микобактерии.

Ранее при исследовании культур клеток костного мозга и перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c, *in vitro* инфицированных микобактериями вакцины БЦЖ (аттенюированный штамм *M. bovis*, *Bacillus Calmette-Guérin*, BCG), мы обнаружили бактерицидную активность препаратов наночастиц металлического серебра Ag(0) размером 2–5, 10–15 и 35–40 нм, предоставленных для тестирования И.Д. Ивановым (Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск), в концентрации 5,0 мкг/мл (Уфимцева и др., 2016). Для инфицирования мышечных клеток была использована вакцина БЦЖ, поскольку при тестировании ряда антимикробных препаратов было найдено хорошее соответствие между результатами, полученными в экспериментах со штаммами *M. tuberculosis* и BCG микобактериями (Altaf et al., 2010). Также, BCG микобактерии – один из модельных объектов для исследования патогенеза микобактерий туберкулезного комплекса в клетках-хозяевах, поскольку имеют тот же состав клеточной стенки, что и возбудители туберкулеза, но безопасны для человека (Shiloh et al., 2010). Однако при совместном культивировании в фосфатном буфере на +37 °С в бактериологических экспериментах наночастицы серебра Ag(0) разного размера в концентрации 5,0 мкг/мл не снижали жизнеспособность грамположительных BCG микобактерий в течение 2–72 ч анализа, одновременно эффективно предотвращая размножение грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и микрококков в этих растворах. Следовательно, анализ механизмов бактерицидного действия наночастиц серебра на внутриклеточные микобактерии в клетках-хозяевах остается актуальной задачей как для развития нанобиотехнологических исследований, так и для использования продуктов нанобиотехнологии в связи с повсеместным распространением штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам.

Исследование механизмов бактерицидного действия наночастиц серебра Ag(0) разного размера в концентрации 5,0 мкг/мл провели в культурах мышинных перитонеальных макрофагов, как инфицированных BCG микобактериями, так и в контрольных клетках без заражения, с добавлением или без добавления в разных сочетаниях индукторов образования активных форм кислорода (перекись водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), апоптоза и аутофагии (АВТ 737), антиоксидантов (восстановленный глутатион GSH или митохондриально направленный LiCl), противотуберкулезного лекарства изониазида. На 2, 4, 6 и 24 ч тестирования в культуры макрофагов вносили прижизненные красители для детекции образования в мышинных клетках активных форм кислорода в цитоплазме (CellROX Deep Red Reagent и H<sub>2</sub>DCFDA) и митохондриях (MitoSOX Red Indicator), активации каспаз 3/7 (CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent), развития апоптоза по определению фосфатидилсерина на внешней плазматической мембране (Annexin V-FITC) или некроза (Hoechst 33342 и PI). Затем флуоресцентные метки проанализировали на приборе In Cell Analyzer 2200. Иммунофлуоресцентно окрашенные препараты культур макрофагов также исследовали на конфокальном микроскопе LSM-780 на активацию продукции iNOS, провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-1 $\alpha$ , генотоксического стресса с определением стабилизации белка P53 в цитоплазме и ядре клеток мышей и образования двунитевых разрывов в ДНК по появлению  $\gamma$ H2AX-меченых фокусов в ядрах макрофагов.

В результате в мышинных макрофагах, инфицированных BCG микобактериями или нет, на 2, 4 и 6 ч тестирования только после добавления наночастиц серебра Ag(0) разного размера наблюдали активацию каспаз 3/7 и развитие апоптоза при отсутствии образования активных форм кислорода: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (детекция с H<sub>2</sub>DCFDA), митохондриального O<sub>2</sub><sup>-</sup> (детекция с MitoSOX Red Indicator) и других типов (детекция с CellROX Deep Red Reagent). Проведенный анализ не выявил активации продукции провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-1 $\alpha$ , iNOS и развития генотоксического стресса во всех исследованных культурах макрофагов, инкубированных как с BCG микобактериями, так и с наночастицами серебра Ag(0) разного размера, в том числе при совместном культивировании на всех сроках тестирования. Увеличение образования активных форм кислорода (детекция с CellROX Deep Red Reagent) обнаружили на 24 ч эксперимента только в культурах макрофагов, инфицированных BCG микобактериями, при культивировании с наночастицами серебра Ag(0) размером 35-40 нм (23,1  $\pm$  0,4 % CellROX-положительных клеток), которое снижалось до цифр, выявленных в контрольных клетках (3,4  $\pm$  0,3 % CellROX-положительных клеток), при добавлении антиоксиданта GSH (1,4 $\pm$ 0,2% CellROX-положительных клеток), но не LiCl (16,3  $\pm$  0,4 % CellROX-положительных клеток). Однако во всех культурах макрофагов не обнаружили увеличения производства ни H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (детекция с H<sub>2</sub>DCFDA), ни митохондриального O<sub>2</sub><sup>-</sup> (детекция с MitoSOX Red Indicator). Вероятно, увеличение окислительных продуктов, детектируемых с помощью CellROX Deep Red Reagent, именно в инфицированных макрофагах произошло из-за усиления элиминации микобактерий в лизосомах клеток, поскольку в этот период времени наблюдали появление колокализации BCG микобактерий, визуализированных с использованием антител на главный гликолипид клеточной стенки микобактерий липоарабиноманнан, со структурами, окрашенными маркером лизосом LysoTracker Red DND-99.

В итоге, проведенное исследование показало, что в основе бактерицидного и проапоптозного действия использованных наночастиц серебра Ag(0) в мышинных макрофагах, инфицированных *in vitro* микобактериями вакцины БЦЖ, нет активации ни окислительного, ни генотоксического стрессов, которые по данным литературы (Dayem et al., 2017; Wang et al., 2017) предполагались основными механизмами действия использованных препаратов. Также не обнаружили активации продукции провоспалительных молекул и цитокинов в исследованных мышинных клетках. Следовательно, необходимо

продолжение поиска механизмов действия наночастиц серебра Ag(0) разного размера на микобактерии в макрофагах мышей.

Благодарим за препараты наночастиц серебра Ag(0) И.Д. Иванова, за помощь в работе на конфокальном микроскопе LSM-780 С.И. Байбородина (Центр коллективного пользования по микроскопическим исследованиям ФНЦ ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и на приборе In Cell Analyzer 2200 Е.В. Воронцову (Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск).

#### Литература

Уфимцева Е.Г., Попов А.В., Иванов И.Д. Биологическая активность наночастиц металлического серебра разного размера в клетках костного мозга и перитонеальной полости мышей, инфицированных вакциной БЦЖ *in vitro* // Биофармацевтический журнал. – 2016. – Т. 8. – С. 52-60.

Altaf M., Miller C.H., Bellows D.S., O'Toole R. Evaluation of the *Mycobacterium smegmatis* and BCG models for the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* inhibitors // Tuberculosis. – 2010. – V. 90. – P. 333–337.

Dayem A.A., Hossain M.K., Lee S.B., Kim K., Saha S.K., Yang G.-M., Choi H.Y., Cho S.-G. The role of reactive oxygen species (ros) in the biological activities of metallic nanoparticles // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – V. 18. – Article 120. – P. 1–21.

Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes // Molecules. – 2016. – V. 21. – Article 836. – P. 1–30.

Shiloh M., DiGiuseppe Champion P.A. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? // Current Opinion in Microbiology. – 2010. – V. 13. – P. 86–92.

Wang L., Hu C., Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – V. 12. – P. 1227–1249.