МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ
MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*

Богачева Н.В. [1],
Хасаншина З.Р. [2],
Тунева Н.А. [1]

[1] ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России (610998, г. Киров, ул. Карла Маркса, 112, Россия)
[2] ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет» (610000, г. Киров, ул. Московская, 36, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Богачева Наталья Викторовна,
e-mail: bogacheva70@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Рост антибиотикорезистентности Helicobacter pylori – микроорганизма, значимого в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта и воспалительных заболеваний пародонта, – заставляет задуматься о поиске новых подходов к эрадикации микроорганизма. Одним из вариантов решения данной проблемы может быть разработка иммунобиологических препаратов на основе микроорганизмов, инактивированных наночастицами коллоидного серебра (НчКС).

***Цель исследования**. Оценить инактивирующую способность наночастиц коллоидного серебра in vitro и in vivo в отношении H. pylori для определения возможности их использования при разработке специфического иммунобиологического препарата.*

***Материалы и методы**. Дизайн исследования состоял в последовательном выполнении этапов синтеза наночастиц коллоидного серебра с оценкой кондиционности полученных препаратов; выделении и идентификации чистой культуры H. pylori; его инактивации синтезированными наночастицами серебра; оценке результата инактивации H. pylori in vitro и in vivo.*

***Результаты.** Кондиционность синтезированных наночастиц коллоидного серебра размером 30 ± 3 нм, полученных при помощи пошаговой методики, была оценена методом электронной микроскопии.*

Проверка инактививрующей активности НчКС на H. pylori показала, что воздействие их на культуру в течение 3 часов при соотношении объёмов НчКС и культуры 1:1 приводит к постепенному снижению концентрации микроорганизма до полной его гибели и отсутствия роста на пятом пассаже.

В ходе оценки действия НчКС на H. pylori было показано, что инактивированная культура сохраняет свои культуральные и тинкториальные свойства; изменяет морфологические свойства и биохимическую активность; становится более чувствительной к антибиотикам и к L. acidophilus; перестаёт приживаться в организме мышей с состоянием иммуносупрессии.

***Заключение.** Предложенный способ синтеза наночастиц серебра с доказанной инактивирующей активностью в отношении H. pylori может стать этапом биотехнологического процесса разработки вакцинного препарата как на основе данного микроорганизма, так и в комплексе непосредственно с НчКС, обладающими противомикробным эффектом, антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью.*

***Ключевые слова:** наночастицы коллоидного серебра, способ синтеза наночастиц коллоидного серебра, Helicobacter pylori, оценка инактивирующей активности микроорганизма, иммунобиологический препарат*

Статья поступила: 17.08.2021
Статья принята: 14.10.2021
Статья опубликована: 17.11.2021

Для цитирования: Богачева Н.В., Хасаншина З.Р., Тунева Н.А. Оценка перспективы использования наночастиц коллоидного серебра для инактивации *Helicobacter pylori*. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(5): 81-91. doi: 10.29413/ABS.2021-6.5.8

ASSESSMENT OF THE PROSPECT FOR THE USE OF COLLOIDAL SILVER NANOPARTICLES FOR INACTIVATION OF *HELICOBACTER PYLORI*

Bogacheva N.V. [1], **Khasanshina Z.R.** [2], **Tuneva N.A.** [1]

[1] Kirov State Medical University (Karla Marksa str. 112, Kirov 610998, Russian Federation)
[2] Vyatka State University (Moskovskaya str. 36, Kirov 610000, Russian Federation)

Corresponding author:
Natalya V. Bogacheva,
e-mail: bogacheva70@mail.ru

ABSTRACT

Background. *The growth of antibiotic resistance of Helicobacter pylori, a microorganism significant in the development of gastrointestinal diseases and inflammatory periodontal diseases, makes us think about the search for new approaches to the eradication of the microorganism. One solution to this problem may be to develop immunobiological preparations based on microorganisms inactivated with colloidal silver nanoparticles (CSNPs).*
The aim. *To evaluate the inactivating ability of colloidal silver nanoparticles in vitro and in vivo with respect to H. pylori to determine the possibility of their use in the development of a specific immunobiological preparation.*
Materials and methods. *The study design consisted in sequential execution of the steps of synthesis of colloidal silver nanoparticles with an assessment of the conditionality of the prepared preparations; isolating and identifying pure H. pylori culture; inactivation of H. pylori by synthesized silver nanoparticles; evaluation of the result of H. pylori inactivation in vitro and in vivo.*
Results. *The conditionality of the synthesized colloidal silver nanoparticles of size 30 ± 3 nm, obtained using a step-by-step technique, was estimated by electron microscopy. Testing the inactivating activity of CSNPs on H. pylori showed that their effect on the culture for 3 hours at a ratio of volumes of CSNPs and 1:1 culture leads to a gradual decrease in the concentration of the microorganism until its complete death and lack of growth on the fifth passage.*
During the evaluation of the effect of CSNPs on H. pylori, it was shown that the inactivated culture retains its cultural and tinctorial properties; alters morphological properties and biochemical activity; becomes more sensitive to antibiotics and L. acidophilus; ceases to establish in the body of mice with an immunosuppression condition.
Conclusions. *Proposed method of synthesis of silver nanoparticles with proven inactivating activity against H. pylori can become a stage of biotechnological process of development of vaccine preparation both on the basis of given microorganism and in complex with CSNPs possessing multilevel antimicrobial effect, antioxidant and immunomodulating activity.*

Key words: *colloidal silver nanoparticles, Helicobacter pylori, gastrointestinal diseases, periodontal diseases, antibiotic resistance, immunobiological preparation, immunosuppression, vaccines*

Received: 17.08.2021
Accepted: 14.10.2021
Published: 17.11.2021

For citation: Bogacheva N.V., Khasanshina Z.R., Tuneva N.A. Assessment of the prospect for the use of colloidal silver nanoparticles for inactivation of *Helicobacter pylori*. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(5): 81-91. doi: 10.29413/ABS.2021-6.5.8

Инфекция *Helicobacter pylori* является одной из наиболее распространённых бактериальных инфекций. Около 50 % населения земного шара инфицировано данным микроорганизмом [1]. Бактерии *H. pylori*, в 70,0–80,0 % случаев являются причиной развития хронического гастрита, в 50,0–60,0 % случаев – важнейшим фактором патогенеза язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка; более чем у 90,0 % пациентов развиваются MALT-лимфомы желудка, ассоциированные с *H. pylori* [2]. По данным научных исследований, *H. pylori* является проблемой не только в гастроэнтерологии, но и в стоматологии. Немногочисленные научные данные свидетельствуют о способности данного микроорганизма в случае его носительства в зубодесневых карманах вызывать развитие воспалительного процесса в пародонте. Само же носительство микроорганизма может влиять на рецидивирующее течение хеликобактериоза и возможность реинфицирования [3].

Основным способом борьбы с данной инфекцией являются антибактериальные препараты, входящие в различные схемы эрадикационной терапии [4]. Однако несмотря на свою эффективность, эрадикационная терапия вызывает развитие устойчивости *H. pylori* к антибактериальным препаратам. Это в свою очередь вызывает необходимость постоянной корректировки схем лечения с привлечением новых антибиотиков или их комбинаций. Именно поэтому актуальным является поиск новых и эффективных методов лечения и профилактики инфекции *H. pylori*. Одним из перспективных направлений для борьбы с данной инфекцией и заболеваниями, ассоциированными с ней, является разработка безопасных и эффективных вакцинных препаратов, направленных на профилактику хеликобактериоза.

При разработке вакцин применяют различные методы инактивации микроорганизмов [5, 6]. Наночастицы серебра имеют ряд преимуществ перед используемыми физическими и химическими методами и позволяют рассматривать их в качестве инактивирующего агента в отношении многих микроорганизмов, в том числе *Helicobacter pylori* [7]. Обладая уникальными физическими, химическими и биологическими свойствами, высокой антибактериальной, противовоспалительной, антиоксидантной и иммуномодулирующей активностью, они могут быть использованы и в качестве дополнительного компонента иммуннобиологических препаратов [8].

Всё вышесказанное обосновывает актуальность и **цель исследования** – оценить инактивирующую способность наночастиц коллоидного серебра *in vitro* и *in vivo* в отношении *H. pylori* для определения возможности их использования при разработке специфического иммунобиологического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования состоял из следующих этапов: синтез наночастиц коллоидного серебра с оценкой кондиционности полученных препаратов; выделение и идентификация чистой культуры *H. pylori;* инактивация синтезированными наночастицами серебра *H. pylori*; оценка результата инактивации *H. pylori in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена в рамках НИР и грантовой программы ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России «Университетский научный грант» в рамках проекта «Создание коллекции микроорганизмов, статистически значимых в развитии периимплантитов, для разработки иммунобиологического препарата направленного действия» № 1-1.1/2021 на базе централизованной клинико-диагностической лаборатории КОГБУЗ «Кировская областная клиническая больница».

Для синтеза наночастиц коллоидного серебра (НчКС) использовали нитрат серебра $AgNO_3$ (Sigma-Aldrich, США), цитрат натрия $Na_3C_6H_5O_7$ безводный (Sigma-Aldrich, США), дистиллированную воду (ГОСТ 6709-72). Все реагенты готовили на деионизированной воде (ГОСТ 11.029.003-80). Процесс синтеза проводили в стеклянной колбе, используя обратный холодильник и магнитную мешалку с подогревом (Meidolph, Германия). Всю лабораторную посуду предварительно обрабатывали смесью концентрированной соляной и азотной кислот («Реахим», Россия) в соотношении 3:1. Оценку всех полученных препаратов коллоидного серебра проводили с помощью электронного трансмиссионного микроскопа JEM1011 (Jeol, Япония).

Выделение культуры *H. pylori* осуществляли из пародонтальных карманов пациентов, имеющих в анамнезе заболевания желудочно-кишечного тракта. Биологический материал забирали на базе частной стоматологической клиники ООО «Стоматологическая клиника» (г. Киров). Всеми добровольцами, участвующими в исследовании, было подписано «Добровольное информированное согласие на обследование». Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой, согласно требованиям Конвенции о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины [9]. Забор биологического материала из пародонтальных карманов проводили с помощью стерильных деревянных палочек с ватой на конце. Конец палочки помещали на 2–3 с в пародонтальный карман, после чего вносили в стерильные одноразовые пробирки со специальной гелиевой транспортной средой Амиеса (Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., Ltd, Китай). Пробирку плотно закрывали крышкой и доставляли в лабораторию в течение 2 часов, соблюдая рекомендуемый производителем диапазон температур от 4 до 24 °С.

Для культивирования *H. pylori* использовали колумбийский агар (Oxoid LDT, Англия). Для приготовления питательной среды навеску колумбийского агара массой 3,9 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Питательную среду стерилизовали автоклавированием острым паром при температуре 121 °С под давлением 1,1 атм в течение 20–25 мин. После охлаждения среды до 45 °С в неё добавляли по 30 мкг амфотерицина («Синтез», Россия), ванкомицина Б («Красфарма», Россия) и 5 мл сыворотки крупного рогатого скота (АО «НПО «Микроген», Россия). Культуру выращивали в течение 5 сут. при температуре 37 °С в анаэростате с газогенераторными пакетами для микроаэрофилов (Oxoid, Великобритания).

Идентификацию выделенной культуры осуществляли на бактериологическом анализаторе «Vitek2 Compact» (BioMerieux, Франция).

Оценку изменения морфологических и биохимических свойств *H. pylori* после инактивации НчКС проводили визуально по описанию морфологических свойств колоний; методом микроскопии на микроскопе («Микмед», Россия); по изменению биохимической активности с использованием оксидазного, уреазного и каталазного тестов. Анализ изменения антибиотикорезистентности осуществляли диско-диффузионным методом [10], используя диски с антибиотиками («НИФЦ», Санкт-Петербург). Изменение антагонистической активности в отношении лактобактерий проводили, используя «Лактобактерин сухой» (АО «НПО «Микроген», Россия), а также диско-диффузионным методом, пропитывая диски различными концентрациями *Lactobacillus acidophilus* и накладывая их на поверхность среды, засеянной *H. pylori*.

Инактивирующую способность НчКС в отношении *H. pylori* определяли по приживаемости культуры на животных. Для этого в работе использовали 20 аутбредных мышей, находящихся в медико-биологическом центре биомоделирования ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России. Всех животных в центре биомоделирования содержали в одинаковых стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде, при 12-часовом световом режиме в течение 1 недели до начала эксперимента. Содержание лабораторных животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.04-96), Приказу Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Все работы с животными проводили в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11], а также морально-этическими принципами проведения биомедицинских экспериментов на животных, сформулированными Международным советом медицинских научных обществ (CIOMS) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Проведение эксперимента одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России.

Для создания состояния иммуносупрессии на аутбредных мышах использовали дексаметазон 4 мг/мл (АО «Научно-производственный центр «ЭЛЬФА», Россия) в дозах, обоснованных в патенте на изобретение «Способ расчёта дозы дексаметазона для разработки биологической модели иммуносупрессии на мышах» [12].

Схема введения дексаметазона и культуры животным выглядела следующим образом: 1-я (10 мышей) и 2-я (10 мышей) группы животных получали дексаметазон в дозе 40 мг на животное в сутки в течение трёх дней внутрибрюшинно; с 4-го по 8-й день (пятикратно) от момента последнего введения дексаметазона животным 1-й группы перорально вводили исходную культуру *H. pylori* в объёме 0,2 мл в концентрации 1×10^9 кл./мл, животным 2-й группы – инактивированную культуру в том же объёме и концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с дизайном исследования на первом этапе отработали пошаговую методику получения наночастиц коллоидного серебра.

Сущность получения наночастиц серебра размером 30 ± 3 нм в объёме 96 мл, основанная на восстановлении и стабилизации нитрата серебра ($AgNO_3$) цитратом натрия ($Na_3C_6H_5O_7$) при соотношении концентраций растворов $AgNO_3/Na_3C_6H_5O_7$ 1:0,75 и их объёмов 5:1 предусматривает выполнение следующих условий [13]:

1. В колбе Эрленмейера на деионизированной воде готовят 80 мл 0,002 М раствора $AgNO_3$ и вносят «перемешивающий» стержень магнитной мешалки.
2. На колбу надевают дефлегматор и устанавливают её на магнитную мешалку с подогревом, на которой устанавливают температуру 300 °С и режим перемешивания 375 об./мин.
3. При появлении первых признаков закипания, которые подтверждает начало стекания конденсата по стенкам дефлегматора и/или колбы, вносят 16 мл 0,0075 М раствора $Na_3C_6H_5O_7$, приготовленного на деионизированной воде.
4. При изменении цвета раствора на желтоватый меняют режим перемешивания на 500 об./мин, температуру – на 200 °С.
5. С момента изменения цвета раствора на жёлтый его кипятят в течение 20 мин, после чего отсоединяют обратный холодильник, снимают колбу с магнитной мешалки и дают остыть при комнатной температуре в течение 18–24 ч.

Данный способ может быть использован для приготовления препаратов НчКС другого объёма, для чего необходимо сделать пересчёт, соблюдая соотношение объёмов и концентраций реагентов $AgNO_3/Na_3C_6H_5O_7$.

Конечная концентрация НчКС в растворе должна составлять не менее 1 мг/мл.

Результаты оценки серий препаратов НчКС, представленные в таблице 1, подтверждают работоспособность способа пошагового получения наночастиц коллоидного серебра цитратным методом [13].

Синтезированные НчКС (серия препарата № 12) были проанализированы по возможности использования для инактивации культуры *H. pylori*.

Для этого культуру *H. pylori*, выделенную и идентицфицированную, как описано в разделе «Материалы и методы», засевали на чашки Петри с селективной питательной средой в объёме 100 мкл и инкубировали в течение 5 сут. при 37 °С в анаэростате с соблюдением микроаэрофильных условий (5 % O_2, 5–10 % CO_2, 85–90 % N_2).

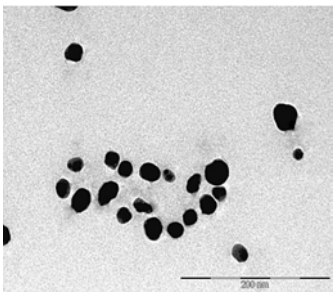
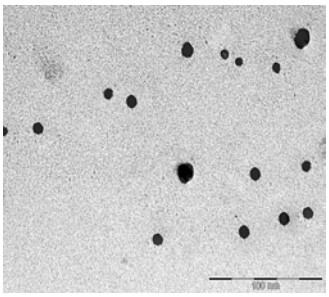
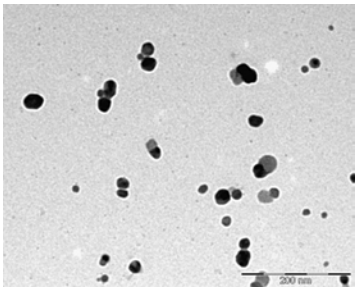
Выросшую культуру *H. pylori* смывали с чашек Петри 0,9%-м стерильным физиологическим раствором хлорида натрия (pH = 7,0 ± 0,2) и доводили этим же раствором до концентрации 1×10^9 м.к.×см$^{-3}$, используя стандарт мутности МакФарланда (HiMedia Laboratories, Индия). Культуру в данной концентрации инактивировали НчКС в соотношении объёмов 1:1. Пробирку со смесью помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение трёх часов.

ТАБЛИЦА 1

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПОЛУЧЕННЫХ СЕРИЙ ПРЕПАРАТОВ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА

TABLE 1

EVALUATION RESULTS OF THE OBTAINED SERIES OF COLLOID SILVER NANOPARTICLES

Показатель	Значения показателя для препарата коллоидного серебра серии № …		
	10	11	12
Цвет коллоидного раствора	Зеленовато-оливковый	Зеленовато-оливковый	Зеленовато-оливковый
Форма частиц (по данным электронной микроскопии)	Округлые ровные частицы с ровными краями. В поле зрения расположены равномерно, отдельно друг от друга. Имеют одинаковую электронную плотность	Округлые ровные частицы с ровными краями. В поле зрения расположены равномерно, отдельно друг от друга. Имеют одинаковую электронную плотность	Округлые ровные частицы с ровными краями. В поле зрения расположены равномерно, отдельно друг от друга. Имеют одинаковую электронную плотность
Однородность по форме и размеру	Однородные	Однородные	Однородные
Наличие конгломератов	Нет	Нет	Нет
Средний диаметр частиц, нм (по данным электронной микроскопии)	35	31	32
Фотография препарата наночастиц коллоидного серебра			

Временной интервал инкубации 3 часа был использован как наиболее оптимальный после серий экспериментов по сравнительной оценке периодов инкубации 1, 2 и 3 часа при соблюдении остальных условий эксперимента (концентрации культуры и объёмов 1:1).

В качестве контроля использовали смесь культуры с 0,9%-м хлоридом натрия с таким же соотношением объёмов и концентрации культуры.

Через 3 часа проводили высев 100 мкл содержимого из опытной и контрольной пробирок на три чашки Петри.

Засеянные чашки Петри инкубировали в течение 5 сут. при тех же условиях. Далее процесс инактивации повторяли по вышеописанной схеме четырёхкратно. Результаты инактивации представлены в таблице 2.

Результат, представленный в таблице 2, свидетельствует о положительном инактивирующем действии наночастицами серебра при выбранном режиме инактивации, которое на пятом пассаже характеризовалось полным отсутствием роста культуры *H. pylori*.

Оценку эффективности инактивации *H. pylori* проводили путём сравнения исходной и полученной после инактивации микробных культур после четвёртого пассажа *in vitro* и *in vivo*.

При оценке морфологических свойств колоний исходной и инактивированной культур *H. pylori* статистически значимых изменений выявлено не было.

Микроскопия мазков, окрашенных по Граму, позволила определить принадлежность обеих культур к Грам (–) микроорганизмам. Однако в морфологии клеток *H. pylori* при микроскопии наблюдались изменения. Исходная культура представляла типичные микроорганизмы изогнутой или слегка спиральной формы (рис. 1), инактивированная культура имела кокковидную форму (рис. 2).

Оценку степени инактивации культуры *H. pylori* проводили путём постановки каталазного, оксидазного и уреазного тестов.

Результаты исследования биохимических свойств культуры *H. pylori* до и после инактивации представлены в таблице 3.

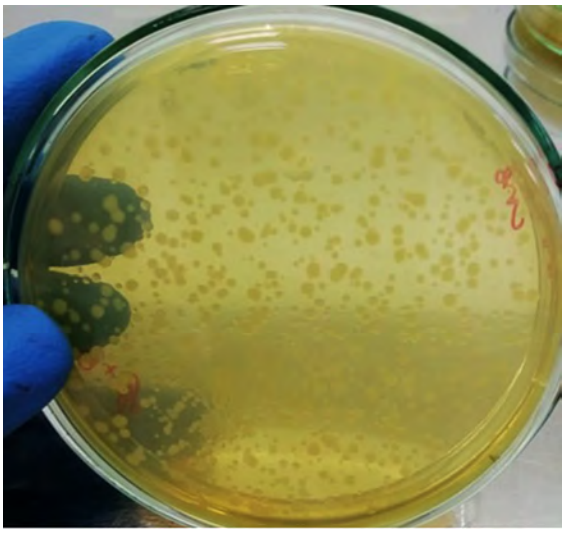
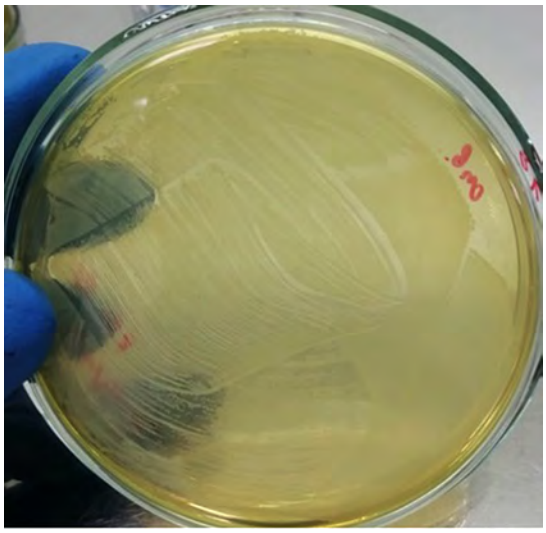
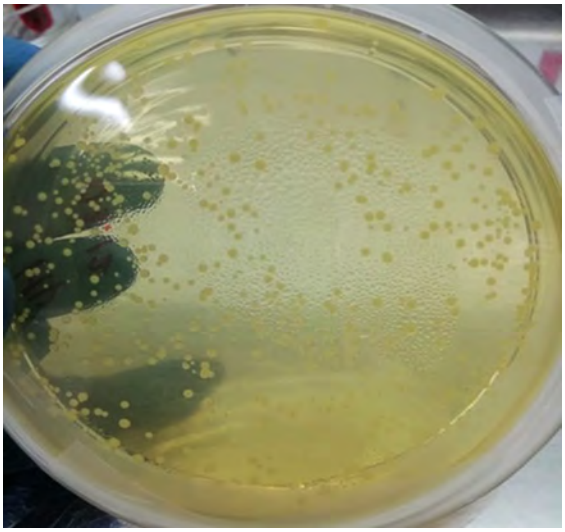
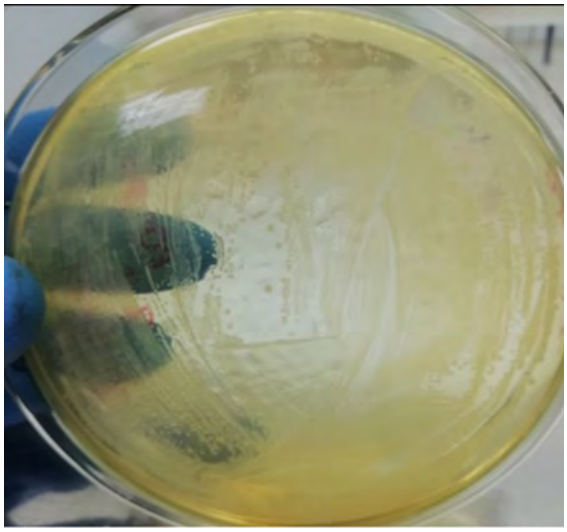
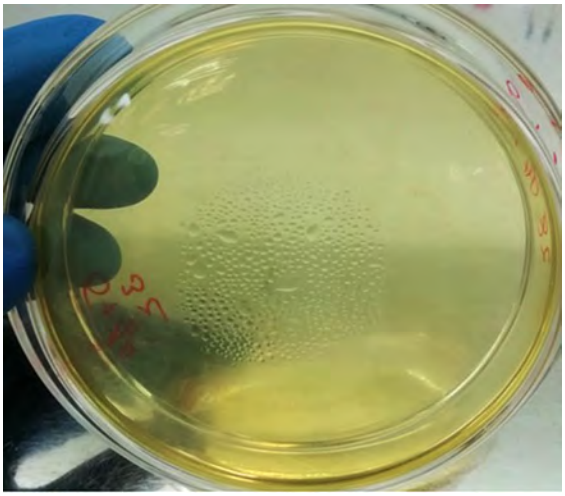
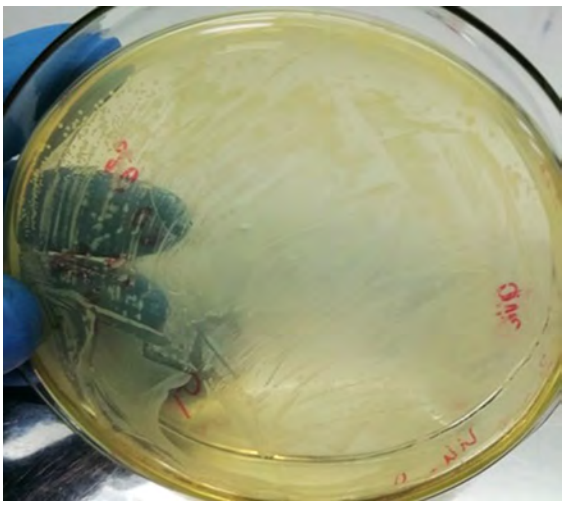
Исходя из данных, представленных в таблице 3, установлено, что исходная культура *H. pylori* обладает положительной каталазной, оксидазной и уреазной активностью, у инактивированной же культуры наблюдается изменение ферментативной активности, которое проявляется в ослаблении каталазной активности и исчез-

ТАБЛИЦА 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИНАКТИВАЦИИ *H. PYLORI* НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА

TABLE 2

RESULTS OF *H. PYLORI* INACTIVATION WITH COLLOIDAL SILVER NANOPARTICLES

№ пассажа	Результат инактивации *H pylori* наночастицами коллоидного серебра	Контроль
1		
	$4{,}3 \cdot 10^3$ КОЕ/мл	Сплошной газон
4		
	$1{,}2 \cdot 10^3$ КОЕ/мл	Сплошной газон
5		
	Рост колоний отсутствует	Сплошной газон

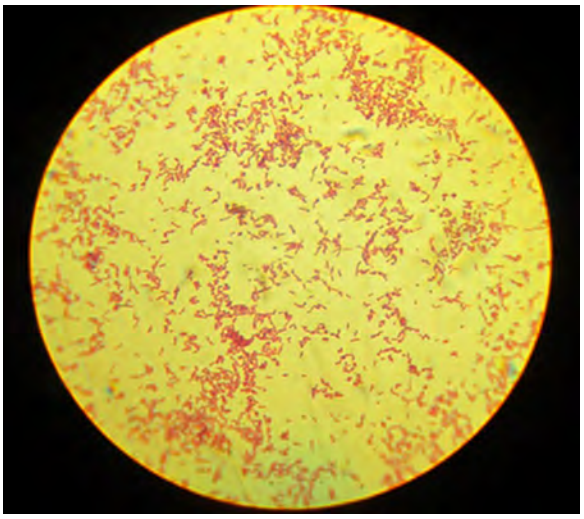


РИС. 1.
Клетки исходной культуры H. pylori (окраска по Граму)
FIG. 1.
H. pylori original culture cells (Gram staining)

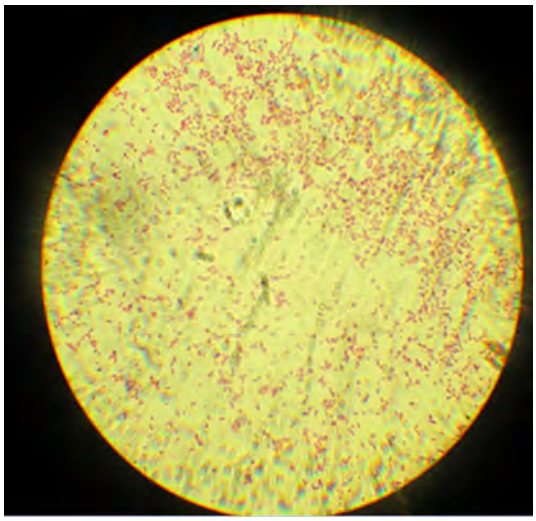


РИС. 2.
Клетки H. pylori после четырёхкратной инактивации наночастицами серебра (окраска по Граму)
FIG. 2.
H. pylori cells after quadruple inactivation with silver nanoparticles (Gram staining)

новении оксидазной активности, что может быть результатом аттенуации, развившейся на фоне воздействия наночастиц серебра.

ТАБЛИЦА 3

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИСХОДНОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ *H. PYLORI*

TABLE 3

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF INITIAL AND INACTIVATED *H. PYLORI* CULTURE

Биохимические тесты	Исходная культура *H. pylori*	Инактивированная культура *H. pylori*
Каталазный тест	+	±
Оксидазный тест	+	–
Уреазный тест	+	+

Оценку антибиотикочувствительности проводили диско-диффузионным методом [10] трёхкратно для каждого антибиотика с исходной и инактивированной культурой. Результаты оценки антибиотикочувствительности культуры *H. pylori* до и после инактивации представлены в таблице 4.

Исходя из данных, представленных в таблице 4, обе исследуемые культуры проявляют высокую чувствительность в отношении ципрофлоксацина, амоксициллина и левофлоксацина. Исходная культура резистентна к оксациллину и тетрациклину. После четырёхкратной инактивации культура *H. pylori* становится чувствительна к данным антибиотикам. Наблюдается общая тенденция к повышению чувствительности инактивированной культуры к антибиотикам.

Результаты оценки антагонистической активности *L. acidophilus* в отношении *H. pylori* показали, что по мере уменьшения концентрации *L. acidophilus* происходит снижение чувствительности как исходной, так и инактивированной культуры *H. pylori*. Инактивированная культура более чувствительна к пробиотику, особенно это наблюдается при низких концентрациях: при воздействии *L. acidophilus* в концентрации $2{,}5 \cdot 10^8$ м.к.·см$^{-3}$ чувствительность инактивированной культуры выше исходной в 3,8 раза; при воздействии концентрации $1{,}25 \cdot 10^8$ м.к.·см$^{-3}$ – в 1,74 раза (табл. 5).

Далее в соответствии с дизайном исследования провели оценку эффективности инактивации *H. pylori in vivo* по анализу приживаемости микроорганизма в организме аутбредных мышей.

Для этого использовали 20 мышей, сформированных в опытную и контрольную группы. Введение животным дексаметазона и культуры *H. pylori* проводили согласно схеме, представленной в разделе «Материалы и методы». На 9-й день от начала эксперимента мышей из опытной и контрольной групп подвергли медикаментозной эвтаназии с помощью диэтилового эфира. У каждого животного выделяли желудок и проводили гомогенизацию тканей органа, используя 1 мл стерильного раствора натрия хлорида, стерильную керамическую ступку и пестик. Полученную от каждого животного суспензию тканей желудка в объёме 100 мкл засевали на отдельно взятую чашку Петри с селективной средой.

Через 5 суток после инкубации на всех чашках Петри, засеянных материалом, полученным от животных из 1-й группы, наблюдали рост непрозрачных, выпуклых колоний размером 0,5–2 мм, похожих на капли росы. По результатам микроскопии мазков, сделанных из выросших колоний, были обнаружены тонкие изогнутые Грам (–) палочки размером от 2 до 4 мм. При биохимическом исследовании чистой культуры выявлена положительная уреазная, оксидазная и каталазная активность,

ТАБЛИЦА 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОЧУВСТИВТЕЛЬНОСТИ ИСХОДНОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУР *H. PYLORI* ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ

TABLE 4

RESULTS OF DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF INITIAL AND INACTIVATED *H. PYLORI* CULTURE USING DISK DIFFUSION TEST

Название антибиотика	Культура *H. pylori*			
	исходная		инактивированная	
	Средний размер зоны ингибиции роста, мм	Чувствительность к антибиотикам	Средний размер зоны ингибиции роста, мм	Чувствительность к антибиотикам
Кларитромицин	13,7	Чувствительная	15,0	Чувствительная
Доксициклин	14,7	Чувствительная	15,0	Чувствительная
Оксациллин	5,7	Резистентная	9,3	Низкочувствительная
Ципрофлоксацин	28,0	Высокочувствительная	30,0	Высокочувствительная
Фуразолидон	20,0	Чувствительная	17,7	Чувствительная
Амоксициллин	26,0	Высокочувствительная	29,7	Высокочувствительная
Метронидазол	10,0	Низкочувствительная	12,3	Чувствительная
Тетрациклин	6,0	Резистентная	11,0	Чувствительная
Рифабутин	12,0	Чувствительная	14,7	Чувствительная
Левофлоксацин	19,6	Высокочувствительная	23,0	Высокочувствительная

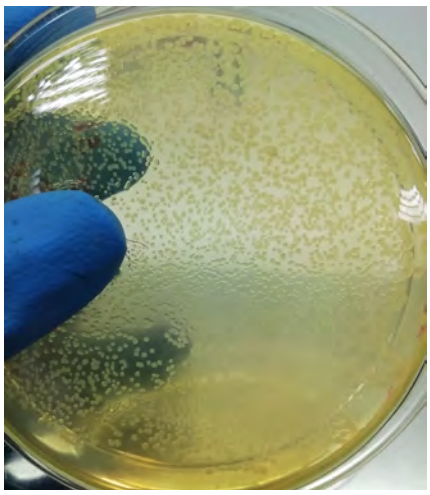
ТАБЛИЦА 5

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *L. ACIDOPHILUS* В ОТНОШЕНИИ *H. PYLORI* ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ

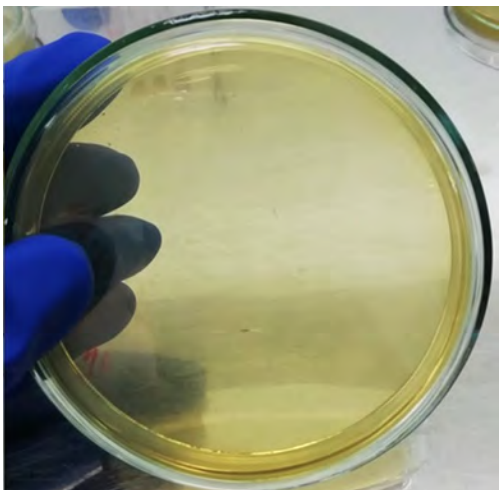
TABLE 5

RESULTS OF ASSESSMENT OF *L. ACIDOPHILUS* ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *H. PYLORI* USING DISK DIFFUSION TEST

Концентрации *L. acidophilus*, м.к.·см$^{-3}$	Культура *H. pylori*			
	исходная		инактивированная	
	Средний размер зоны ингибиции роста, мм	Чувствительность	Средний размер зоны ингибиции роста, мм	Чувствительность
$1 \cdot 10^9$	21,3	Высокочувствительная	23,0	Высокочувствительная
$5 \cdot 10^8$	12,7	Чувствительная	13,7	Чувствительная
$2{,}5 \cdot 10^8$	5,3	Резистентная	11,0	Чувствительная
$1{,}25 \cdot 10^8$	5,0	Резистентная	8,7	Резистентная



а



б

РИС. 3.

*Результаты посевов из биологического материала от животных 1-й (**а**) и 2-й (**б**) групп*

FIG. 3.

*Culture results from biological material from mice from the 1st (**a**) group and the 2nd (**б**) groups*

характерная для данного микроорганизма. Кроме этого, принадлежность культуры, выделенной из биологического материала животных опытной группы, к *H. pylori* была подтверждена при тестировании чистой культуры с использованием иммунохроматографической тест-системы «РЭД Helicobacter pylori» (Россия) и масспектрометра. На чашках Петри, засеянных биологическим материалом, полученным от животных из 2-й группы, роста колоний *H. pylori* выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рост антибиоткорезистентности *H. pylori* заставляет задуматься о поиске новых подходов к эрадикации микроорганизма. Одним из вариантов решения данной проблемы может быть разработка иммунобиологических препаратов, например, на основе инактивированных культур микроорганизмов. Данные научных исследований показали, что среди перспективных методов инактивации микроорганизмов следует рассматривать наночастицы серебра [14]. Среди многочисленных теорий, объясняющих механизм действия серебра на бактериальную клетку, наиболее распространённой является адсорбционная теория, основанная на потере жизнеспособности микроорганизма в результате взаимодействия электростатических сил, возникающих между отрицательно заряженной клеточной мембраной и положительно заряженными ионами серебра при адсорбции последних бактериальной клеткой. В связи с этим на пути поиска решения проблемы антибиотикорезистентности на первом этапе работы нами были синтезированы наночастицы серебра размером 30 ± 3 нм. Воспроизводимость пошаговой методики синтеза НчКС была доказана путём получения серий препаратов, оцененных методом электронной микроскопии, имевших округлую форму с ровными краями, одинаковую электронную плотность, расположенных в поле зрения равномерно, не образующих конгломератов, что соответствует признакам кондиционности синтезированных наночастиц [13].

Проверку бактерицидной активности синтезированных НчКС провели на *H. pylori*, микроорганизме, значимом в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта и воспалительных заболеваний пародонта. В результате выявлено, что воздействие НчКС при режиме инактивации в течение 3 часов при соотношении объёмов НчКС и культуры 1:1 приводит к постепенному снижению концентрации микроорганизма с полной инактивацией на пятом пассаже.

Проведение инактивации микроорганизмов требует оценки эффективности воздействия инактивирующего агента на микробную культуру. Исходя из этого, применение наночастиц серебра, как и любого другого инактивирующего агента, требует оценки эффективности их воздействия на микроорганизм.

В связи с этим сначала провели оценку уровня инактивации *H. pylori* в условиях *in vitro*. В ходе данных исследований было показано, что инактивированная культура *H. pylori* сохраняет свои культуральные и тинкториальные свойства. Однако в результате аттенуации происходит изменение морфологических и биохимических свойств.

Изменение морфологии *H. pylori*, по данным литературы, возможно при её старении, когда в процессе многократного культивирования спиральный микроорганизм переходит в U-образную или кокковидную форму [1, 15]. Возможные морфологические изменения возникают при нехватке питательных веществ, воздействии антибиотиков и других препаратов, применяемых в эрадикационной терапии, изменении pH и температуры среды, а также при воздействии инактивирующих агентов [2, 16]. Подтверждением подобного изменения явились результаты данной работы, показавшие изменение при микроскопии характерной для *H. pylori* формы Грам (–) изогнутых палочек на Грам (–) кокки в результате инактивирующего действия НчКС.

При оценке инактивированной культуры *H pylori* было отмечено изменение её биохимической активности. Инактивированная культура *H. pylori*, как и в случае с исходной культурой, обладала положительной уреазной активностью, однако положительная каталазная и оксидазная активность после инактивации изменилась соответственно на слабоположительную и отрицательную.

Одним из механизмов действия НчКС является способность их адсорбироваться на клеточной стенке микроорганизма, в состав которой входит пептидогликан. Взаимодействуя с карбоксильными и аминогруппами пептидогликанов, НчКС формируют металлопротеиновые комплексы, что является следствием изменения структуры и устойчивости пептидогликанов. Серебро оказывает аналогичное ингибирующее воздействие на дыхательные ферменты микроорганизмов, участвует в биохимических реакциях, происходящих в клетках. Многие структуры клетки и происходящие в ней биохимические процессы являются точкой приложения действия антибактериальных препаратов. В связи с этим нами была проведена сравнительная оценка антибиотикорезистентности *H. pylori* до и после инактивации. В ходе определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам было показано, что культура, инактивированная наночастицами серебра, была в целом более чувствительной к антинтибактериальным препаратам и в процессе инактивации приобрела большую чувствительность к отдельным антибиотикам, таким как оксациллин и тетрациклин.

По данным научной литературы, доказано проявление антагонистической активности *L. acidophilus* в отношении *H. pylori* [17]. Поэтому при сравнении действия *L. acidophilus* до и после инактивации НчКС было установлено, что инактивированная культура более чувствительна к пробиотику, и данная разница увеличивается при снижении его концентрации.

Обязательным этапом изучения новых иммунобиологических препаратов является оценка их действия на организм биологической модели [18]. *H. pylori* является возбудителем антропонозной инфекции. Однако при

помощи искусственно созданного состояния иммуносупрессии можно оценить эффективность инактивации полученного препарата на животных [19]. В случае эффективности проведённой инактивации *H. pylori* не должна приживаться в организме мышей с состоянием иммуносупрессии, что и было доказано в данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы с использованием пошаговой методики были синтезированы наночастицы коллоидного серебра и определена их инактивирующая активность в отношении *H. pylori*, этиологическая значимость которой в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта и воспалительных заболеваний пародонта не вызывает сомнения. Растущая проблема антибиотикорезистентности способствует поиску новых подходов к эрадикации микроорганизма, среди которых в качестве перспективных следует отметить разработку новых иммунобиологических препаратов. Предложенный способ синтеза наночастиц серебра с доказанной инактивирующей активностью в отношении *H. pylori* может стать этапом биотехнологического процесса разработки вакцинного препарата как на основе данного микроорганизма, так и в комплексе непосредственно с НчКС, обладающими противомикробным эффектом.

Финансирование

«Исследование выполнено при финансовой поддержке грантовой программы ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России в рамках проекта «Создание коллекции микроорганизмов, статистически значимых в развитии периимплантитов, для разработки иммунобиологического препарата направленного действия» № 1-1.1/2021.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori: Physiology and genetics*. Washington: ASM Press; 2001.

2. Mouery K, Rader BA, Gaynor EC, Guillemin K. The stringent response is required for *Helicobacter pylori* survival of stationary phase, exposure to acid, and aerobic shock. *J Bacteriol*. 2006; 188(15): 5494-5500. doi: 10.1128/JB.00366-06

3. Шевела Т.Л. *Helicobacter pylori* – как этиологический фактор развития периимплантита (клинический пример). *Здравоохранение Кыргызстана*. 2020; (2): 11-16.

4. Василевский И.В. Новые подходы к эрадикации *Helicobacter pylori* с использованием нифуроксазида. *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. 2013; (1): 8-14.

5. Бредихин Д.А., Никонов С.Д., Чередниченко А.Г. Фотодинамическая инактивация *Mycobacterium tuberculosis* метиленовым синим *in vitro*. *Туберкулез и болезни легких*. 2019; 97(7): 28-33.

6. Gao S, Lewis GD, Hemar Y. Inactivation of microorganisms by low frequency high-power ultrasound: Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrason Sonochem*. 2014; 21(1): 446-453. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.06.006

7. Saravanakumar K, Chelliah R, MubarakAli D, Oh D-H, Kathiresan K, Wang MH. Unveiling the potentials of biocompatible silver nanoparticles on human lung carcinoma A549 cells and *Helicobacter pylori*. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 57-87. doi: 10.1038/s41598-019-42112-1

8. Abd Al-Rhman RM, Ibraheem SR, Israa AL. The effect of silver nanoparticles on cellular and humoral immunity of mice *in vivo* and *in vitro*. *Iraqi Journal of Biotechnology*. 2016; (2): 21-29.

9. *Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины*. URL: https://docs.cntd.ru/document/901808464 [дата обращения: 16.08.2021].

10. *Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: Клинические рекомендации*. 2021. URL: https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf [дата обращения: 16.08.2021].

11. Миронов А.Н. (ред.). *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К; 2012.

12. Богачева Н.В., Попова С.В., Коротаева К.Н., Исаева Н.В. *Способ расчета дозы дексаметазона для разработки биологической модели иммуносупрессии на мышах:* Патент № 2748123 Рос. Федерация; МПК G09B23/28. № 2020126327; заявл. 04.08.2020; опубл. 19.05.2021.

13. Богачева Н.В., Тарбеева К.А., Огородова Н.Ю., Хасаншина З.Р. *Способ получения наночастиц серебра размером 30 ± 3 нм:* Патент № 2729991 Рос. Федерация; МПК B01J13/00, B82B3/00, B22F9/24. № 2019130690; заявл. 26.09.2019; опубл. 13.08.2020.

14. Selvarani M, Prema P. Evaluation of antibacterial efficacy of chemically synthesized copper and zerovalent iron nanoparticles. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013; 6(3): 223-227.

15. Reshetnyak VI, Reshetnyak TM. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(7): 4867-4878. doi: 10.3748/wjg.v23.i27.4867

16. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appil Environ Microbiol*. 2007; 73(10): 3423-3427. doi: 10.1128/AEM.00047-07

17. Lorca GL, Wadstrom T. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori in vitro*. *Curr Microbiol*. 2001; 42(1): 39-44. doi: 10.1007/s002840010175

18. Богачева Н.В., Зайцева И.В., Попова С.В., Коротаева К.Н. Основные проблемы экспериментальных исследований новых иммунологических препаратов на биологических моделях лабораторных животных. *Вятский медицинский вестник*. 2020; 4(68): 74-81. doi: 10.24411/2220-7880-2020-10135

19. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Горшков А.С., Шабалина М.Р., Смирнова Д.Н., и др. Экспериментальный хеликобактериоз у конвенциональных белых мышей при инфицировании возбудителем *Helicobacter pylori*. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(2): 77-85.

REFERENCES

1. Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori: Physiology and genetics*. Washington: ASM Press; 2001.

2. Mouery K, Rader BA, Gaynor EC, Guillemin K. The stringent response is required for *Helicobacter pylori* survival of stationary phase, exposure to acid, and aerobic shock. *J Bacteriol*. 2006; 188(15): 5494-5500. doi: 10.1128/JB.00366-06

3. Shevela TL. *Helicobacter pylori* – as ethiological factor for periimplantitis (clinical study). *Health Care of Kyrgyzstan*. 2020; (2): 11-16. (In Russ.).

4. Vasilevsky IV. New approaches to the eradication of *Helicobacter pylori* using nifuroxazide. *Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaya praktika i zdorov'e.* 2013; (1): 8-14. (In Russ.).

5. Bredikhin DA, Nikonov SD, Cherednichenko AG, Petrenko TI, Korbut AI. *In vitro* photodynamic inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* by methylene blue. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019; 97(7): 28-33. (In Russ.).

6. Gao S, Lewis GD, Hemar Y. Inactivation of microorganisms by low frequency high-power ultrasound: Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrason Sonochem*. 2014; 21(1): 446-453. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.06.006

7. Saravanakumar K, Chelliah R, MubarakAli D, Oh D-H, Kathiresan K, Wang MH. Unveiling the potentials of biocompatible silver nanoparticles on human lung carcinoma A549 cells and *Helicobacter pylori*. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 57-87. doi: 10.1038/s41598-019-42112-1

8. Abd Al-Rhman RM, Ibraheem SR, Israa AL. The effect of silver nanoparticles on cellular and humoral immunity of mice *in vivo* and *in vitro*. *Iraqi Journal of Biotechnology.* 2016; (2): 21-29.

9. *Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of biology and medicine.* URL: https://docs.cntd.ru/document/901808464 [date of access: 16.08.2021]. (In Russ.).

10. *Detection of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs: Clinical guidelines.* 2021. URL: https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf [date of access: 16.08.2021]. (In Russ.).

11. Mironov AN (ed.). *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs.* Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.).

12. Bogacheva NV, Popova SV, Korotaeva KN, Isaeva NV. *Method for calculating the dose of dexamethasone for the development of a biological model of immunosuppression in mice:* Patent No. 2748123 of the Russian Federation. 2021. (In Russ.).

13. Bogacheva NV, Tarbeeva KA, Ogorodova NYu, Khasanshina ZR. *A method of obtaining silver nanoparticles with a size of 30 ± 3 nm:* Patent No. 2729991 of the Russian Federation. 2020. (In Russ.).

14. Selvarani M, Prema P. Evaluation of antibacterial efficacy of chemically synthesized copper and zerovalent iron nanoparticles. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013; 6(3): 223-227.

15. Reshetnyak VI, Reshetnyak TM. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(7): 4867-4878. doi: 10.3748/wjg.v23.i27.4867

16. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appil Environ Microbiol*. 2007; 73(10): 3423-3427. doi: 10.1128/AEM.00047-07

17. Lorca GL, Wadstrom T. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori in vitro*. *Curr Microbiol*. 2001; 42(1): 39-44. doi: 10.1007/s002840010175

18. Bogacheva NV, Zaitseva IV, Popova SV, Korotaeva KN. Basic problems of experimental studies of new immunobiological preparations on biological models of laboratory animals. *Medical Newsletter of Vyatka.* 2020; 4(68): 74-81. (In Russ.). doi: 10.24411/2220-7880-2020-10135

19. Chicherin IYu, Pogorelsky IP, Lundovskikh IA, Gorshkov AS, Shabalina MR, Smirnova DN, et al. Experimental helicobacteriosis in conventional white mice when infected with *Helicobacter pylori. Infectious Diseases*. 2018; 16(2): 77-85. (In Russ.).

Сведения об авторах

Богачева Наталья Викторовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: bogacheva70@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7021-6232

Хасаншина Зулейха Рамилевна – магистрант, ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», e-mail: khasanshina.99@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1390-3204

Тунева Наталья Александровна – аспирант, ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: tuneva.n.a@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7972-544X

Information about the authors

Natalya V. Bogacheva – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Microbiology, Kirov State Medical University», e-mail: bogacheva70@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-7021-6232

Zuleikha R. Khasanshina – Graduate Student, Vyatka State University», e-mail: khasanshina.99@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1390-3204

Natalya A. Tuneva – Postgraduate, Kirov State Medical University, e-mail: tuneva.n.a@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-7972-544X