

## НОВАЯ МОДЕЛЬ *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

С. Н. Андреевская<sup>1</sup>✉, Т. Г. Смирнова<sup>1</sup>, Е. Н. Антонов<sup>2</sup>, Л. Н. Черноусова<sup>1</sup>, С. Э. Богородский<sup>2</sup>, Е. Е. Ларионова<sup>1</sup>, В. К. Попов<sup>2</sup>, А. Э. Эргешов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт фотонных технологий Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника», Москва, Россия

Создание противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия крайне перспективно, так как позволяет сохранить приверженность больных к лечению при длительных курсах терапии, особенно при химиотерапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью. Традиционно используемый для оценки кинетики выхода препаратов из полимерных носителей метод УФ-спектрофотометрии не подходит для применения в многокомпонентных питательных средах для культивирования микобактерий туберкулеза. Целью исследования было разработать метод оценки высвобождения противотуберкулезных препаратов из биорезорбируемых полимерных носителей, позволяющий проводить скрининг большого числа инкапсулированных пролонгированных форм противотуберкулезных препаратов и отбирать наиболее перспективные композиции. При изучении динамики роста лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии серии концентраций левофлоксацина (от 0,03 до 0,4 мкг/мл) была разработана модель, представляющая собой два параллельно проводимых опыта, позволяющих оценить кинетику высвобождения препарата в культуральную среду. Все эксперименты проводили трехкратно, при оценке использовали методы описательной статистики. Результаты, полученные в этой модели для трех инкапсулированных форм левофлоксацина в биорезорбируемых полимерных носителях из полилактидогликолида (частицы 50 и 100 мкм и матрикс), показали, что кинетика накопления препарата в среде существенно зависит от вида полимерного носителя. Наиболее перспективен из них матрикс, который хорошо включает в себя левофлоксацин и достаточно равномерно высвобождает его при инкубации в питательной среде.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, модель *in vitro*, левофлоксацин, биорезорбируемые полимерные носители, пролонгированное высвобождение

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части развития СКФ методов формирования биоактивных матричных структур, в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ «ЦНИИТ» № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам» в части оценки бактериостатической активности диапазона концентраций левофлоксацина и РФФИ (проект № 18-29-06062 мк) в части разработки лекарственных форм пролонгированного действия и *in vitro* модели оценки их эффективности.

**Вклад авторов:** С. Н. Андреевская — интерпретация результатов, написание текста рукописи; Т. Г. Смирнова — отработка условий для оценки высвобождения левофлоксацина из носителя, обсуждение результатов; Е. Н. Антонов — формирование матриц, обсуждение результатов; Л. Н. Черноусова, А. Э. Эргешов — разработка дизайна исследования, обсуждение результатов; С. Э. Богородский — формирование микрочастиц, обсуждение результатов; Е. Е. Ларионова — анализ литературы, обсуждение результатов; В. К. Попов — разработка метода включения антибиотика в полимеры, обсуждение результатов.

**Соблюдение этических стандартов:** работы с вирулентными штаммами *M. tuberculosis* проводили с соблюдением мер безопасности при работе с патогенами III–IV группы патогенности согласно требованиям СП 1.3.2322-08 (с дополнениями СП 1.3.2518-09 и СП 1.3.2885-11) «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

✉ **Для корреспонденции:** Софья Николаевна Андреевская  
Яузская аллея, д. 2, стр. 1А, г. Москва, 107564; andsofia@mail.ru

**Статья получена:** 06.08.2020 **Статья принята к печати:** 20.08.2020 **Опубликована онлайн:** 30.08.2020

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.050

## NEW *IN VITRO* MODEL TO EVALUATE KINETICS OF ANTIMYCOBACTERIAL DRUG RELEASE FROM BIORESORBABLE POLYMERIC CARRIERS

Andreevskaya SN<sup>1</sup>✉, Smirnova TG<sup>1</sup>, Antonov EN<sup>2</sup>, Chernousova LN<sup>1</sup>, Bogorodsky SE<sup>2</sup>, Larionova EE<sup>1</sup>, Popov VK<sup>2</sup>, Ergeshov AE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Photon Technologies FSRC 'Crystallography and Photonics' RAS, Moscow, Russia

Sustained-release drugs against tuberculosis are a promising approach to therapy since they positively affect patient compliance with long regimens, especially when it comes to the multidrug-resistant form of the disease. Conventional UV-visible spectroscopy does not work well with multicomponental culture media used for growing *M. tuberculosis*. The aim of this study was to develop a method for evaluating the kinetics of anti-tuberculosis drug released from bioresorbable polymeric carriers suitable for screening a wide range of encapsulated prolonged-release drugs and identifying the best performing candidate. While studying the growth dynamics of the laboratory susceptible strain *M. tuberculosis* H37Rv in the presence of different levofloxacin concentrations (from 0.03 to 0.4 µg/ml), we developed a model, which is essentially a set of 2 parallel experiments evaluating the kinetics of drug release into the culture medium. The results of these 2 experiments conducted on 3 encapsulated forms of levofloxacin loaded onto bioresorbable polymeric PLGA carriers (particles sized 50 µm and 100 µm and the matrix) revealed that release kinetics of the drug largely depended on the type of polymeric carrier. The best encapsulation of the antibiotic and its gradual release into the culture medium was observed for the matrix. All experiments were run in 3 replicates. The obtained data were analyzed using descriptive statistics.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro* model, levofloxacin, bioresorbable polymeric carrier, sustained-release

**Funding:** the study was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education and carried out as part of the State Assignment for FSRC "Crystallography and Photonics" RAS (developing an SCF-based method for creating bioactive matrices), as part of the State Assignment № 0515-2019-0015 (Formation of resistance to antimycobacterial drugs in mycobacteria and somatic cells) for the Central Tuberculosis Research Institute (evaluation of the bacteriostatic activity of different levofloxacin concentrations). The study was also supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 18-29-06062 mk: development of sustained-release therapeutic formulations and an *in vitro* model for the evaluation of their efficacy).

**Author contribution:** Andreevskaya SN — interpretation of study results, manuscript preparation; Smirnova TG — modeling of conditions for levofloxacin release from its carriers; discussion of study results; Antonov EN — preparation of matrices; discussion of study results; Chernousova LN, Ergeshov AE — study design; discussion of study results; Bogorodsky SE — preparation of microparticles; discussion of study results; Larionova EE — literature analysis; discussion of study results; Popov VK — method for antibiotic encapsulation into polymeric carriers; discussion of study results.

**Compliance with ethical standards:** manipulations with virulent strains of *M. tuberculosis* were conducted in compliance with the safety guidelines for the experiments involving Risk Group III–IV pathogens, infectious agents and utilization of medical waste specified in sanitary regulations 1.3.2322-08, 1.3.2518-09, 1.3.2885-11, and 2.1.7.2790-10.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sofia N. Andreevskaya  
Yauzskaya alleya, 2, str. 1A., Moscow, 107564; andsofia@mail.ru

**Received:** 06.08.2020 **Accepted:** 20.08.2020 **Published online:** 30.08.2020

**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.050

В последнее десятилетие во всем мире отмечен рост числа случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) [1]. Терапия МЛУ ТБ включает выполнение сложных и длительных лечебных протоколов, что негативно влияет на приверженность пациента к лечению. Поэтому перспективным направлением является разработка лекарственных форм противотуберкулезных препаратов (ПТП) пролонгированного действия, в частности активных субстанций, инкапсулированных в биорезорбируемые полимерные микрокапсулы, обеспечивающие контролируемый пространственный и временной выход препарата из полимерной структуры в окружающие ткани на протяжении 1–4 недель [2]. Применение сверхкритических флюидных технологий (СКФ) позволяет создавать универсальные экологически безопасные микронизированные системы, обеспечивающие полное отсутствие примесей органического растворителя [3]. Время выхода препарата из полимерного носителя во многом зависит от свойств полимерной матрицы (микрочастицы): состава, дисперсности и морфологии микрочастиц носителя. Причем в ряде случаев возможна ситуация, когда лекарственная субстанция располагается преимущественно на поверхности и в приповерхностной области, что приводит к быстрому и плохо контролируемому росту концентрации препарата во внешней среде. Такой высокий начальный выброс препарата представляет собой существенную проблему при использовании полимерных носителей, так как может оказывать токсическое воздействие на организм [4–6].

Для предварительной оценки кинетики высвобождения препарата из полимерных микрочастиц и матриц используют УФ-спектрофотометрию, которая позволяет определить накопление препарата в фосфатно-солевом буфере в процессе инкубации полимерного носителя [4]. Тем не менее эта модель оценки кинетики очень приближена, поскольку для роста бактерий, и особенно микобактерий туберкулеза (МБТ), необходимы многокомпонентные среды, включающие большое число питательных веществ [7], что создает существенные помехи для УФ-спектрометрии и не позволяет использовать этот метод для оценки высвобождения препарата из носителя в условиях, приближенных к естественным.

Поэтому целью исследования была разработка *in vitro* модели для оценки высвобождения ПТП из полимерных носителей в среде, подходящей для культивирования микобактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве лекарственной субстанции для включения в биорезорбируемый носитель был выбран левофлоксацин (LFX) — препарат, обязательный в схеме лечения туберкулеза с МЛУ.

Было запланировано адаптировать модель для работы в автоматизированной системе BACTEC MGIT 960. Преимущества использования системы BACTEC MGIT 960 обусловлены высокой эффективностью стандартизованных и сертифицированных по ISO 9001 производств реагентов и сред, а также применением стандартных протоколов исследования [8]. В системе BACTEC MGIT 960 культивирование микроорганизмов производят в специальных пробирках MGIT, на дне которых расположен связанный флюорофор под полупроницаемой

мембраной. Высвобождение флюорофора и испускание света определенной волны прямопропорционально зависят от потребления микобактериальными клетками кислорода в среде: чем больше активно делящихся клеток, тем интенсивнее они потребляют кислород и тем выше светимость флюорофора. Значимым параметром для определения антимикобактериального эффекта является время начала роста культуры под действием соединения. Существенная (более трех суток) задержка начала роста культуры *M. tuberculosis*, по сравнению с контролем без препарата, свидетельствует о гибели части микобактериальной популяции под действием тестируемого соединения.

## Инкапсулированные формы LFX

В качестве исходного материала для формирования биорезорбируемых полимерных носителей левофлоксацина использовали полилактогликолид (ПЛГ) марки Purasorb PDLG7502 (CorbionPurac; Нидерланды) с вязкостью 0,2 дл/г. В качестве активной субстанции использовали левофлоксацин (Sigma-Aldrich; США). Диоксид углерода марки ОСЧ (99,998%, «НИИМК; Россия) использовали без дополнительной очистки. Антибиотик в количестве 10 мас.% (100 мг LFX на 900 мг полимера) инкапсулировали в ПЛГ-матрицы в пресс-формах цилиндрической формы с использованием сверхкритической флюидной пластификации исходной смеси с ПЛГ и LFX в среде диоксида углерода и ее последующего вспенивания при сбросе давления CO<sub>2</sub> до атмосферного. Микрочастицы со средним размером частиц 50 и 100 мкм получали путем криоизмельчения матриц в роторной мельнице с применением сухого льда (подробнее см. [4]).

Согласно разработанной модели рассчитанное количество полимерного носителя с инкапсулированным LFX инкубировали в среде Middlebrook 7H9 при 37 °C в течение 66 суток с отбором проб среды с выделившимся LFX в установленные сроки.

## Культура МБТ

Исследование проводили на лабораторном чувствительном штамме *M. tuberculosis* H37Rv из коллекции ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза». Во всех экспериментах использовали стандартизованную по КОЕ культуру *M. tuberculosis*, находящуюся в логарифмической фазе роста и представляющую собой суспензию одиночных (неслипшихся) клеток. Для получения суспензии бактериальную массу, выросшую на среде Левенштейна–Йенсена, пассировали при 37 °C на бульоне Дюбо (Difco; США) с 0,5% БСА на протяжении двух циклов по 14 дней. Далее серийные 10-кратные разведения суспензии, профильтрованной через фильтр 5 мкм (Millipore; США), наносили в виде капель (объем капель — 20 мкл) на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco; США). Чашки Петри культивировали при 37 °C, а исходную суспензию хранили при 4 °C. Через 3–4 суток культивирования производили подсчет микроколоний с использованием инвертированного микроскопа Olympus (Olympus; США) ×200. Стандартизованную суспензию микобактерий в объеме 500 мкл засеивали на жидкую среду Middlebrook 7H9 (BD; США) с обогатительной добавкой OADC в пробирки MGIT для последующей автоматической детекции роста микобактерий в системе BACTEC MGIT 960 (BD; США).

### Оценка бактериостатической активности на BACTEC MGIT 960

Бактериостатическую активность соединения оценивали по наличию или отсутствию роста в пробирке с определенной концентрацией препарата. Предварительно проведенное исследование в системе BACTEC MGIT960 на культуре с различным числом КОЕ МБТ показало, что снижение КОЕ не менее чем на 75% (75%-я ингибция роста) приводит к задержке начала роста культуры от трех дней, не менее 90% — от восьми дней, 99% — от 16 дней, 99,9% — 21 дня и т. д. [9]. Время проведения эксперимента составляло 42 дня, согласно протоколу производителя. Все выросшие культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к микобактериям туберкулеза). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Ziehl–Neelsen. Если в положительной пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT TBc ID согласно инструкции изготовителя. Для контроля роста в системе BACTEC MGIT 960 неспецифичной микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При появлении роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 ч инкубации при 37 °С делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифичной микрофлорой.

### Методы статистического анализа

При оценке результатов исследования использовали описательную статистику. Все микробиологические эксперименты проводили трехкратно. Для анализа данных использовали Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft; США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходя из того что для оценки накопления препарата в среде по динамике роста МБТ была использована система BACTEC MGIT960, от непосредственного размещения полимерного носителя с препаратом в пробирке MGIT, используемой в системе BACTEC MGIT 960, решено было отказаться по ряду причин. Во-первых, полимер мог влиять на светимость флюорофора и исказить результаты эксперимента, а во-вторых, при таком построении эксперимента возможна оценка только по конечной точке высвобождения, а не в динамике от первых часов до нескольких дней.

Поэтому полимерный носитель с инкапсулированным препаратом был помещен в культуральную среду Middlebrook 7H9 (эту же среду использовали в пробирках MGIT). Через определенные промежутки времени отбирали пробы среды с выделившимся препаратом (по 100 мкл среды на точку). Количество инкубируемого в среде инкапсулированного в полимерный носитель левофлоксацина рассчитывали таким образом, чтобы при высвобождении всего LFX в 100 мкл среды достигалась концентрация, достаточная для того, чтобы при добавлении этого объема в пробирку MGIT концентрация препарата в среде была равна минимальной ингибирующей концентрации (МИК) LFX.

При учете особенности включения LFX в полимерный носитель (поверхностное или равномерное включение) исходили из того, что поверхностно расположенный препарат будет легко удален из носителя при интенсивной отмывке. Отмывку полимерного носителя проводили средой Middlebrook 7H9 однократно. Для этого полимерный носитель в центрифужной пробирке заливали стерильной

средой объемом 30 мл, интенсивно встряхивали на вортексе, затем центрифугировали в режиме 3000 g при комнатной температуре 5 мин и полностью отбирали супернатант. Отмытый таким образом полимерный носитель использовали в эксперименте. Учитывая возможность поверхностного расположения препарата в полимере, в опыте с отмывкой носителя брали в 2 раза большее количество препарата, чем в опыте с неотмытым носителем, чтобы оставалась вероятность зарегистрировать бактериостатический эффект даже при элиминации части препарата с поверхности. Так, в опыте без отмывки в 30 мл культуральной среды инкубировали 6,3 мг полимера с включенным LFX (содержание LFX составило 0,63 мг). В опыте с отмывкой в 30 мл культуральной среды инкубировали 12,6 мг полимера с включенным LFX (содержание LFX составило 1,26 мг).

Таким образом, предложенная модель представляет собой два параллельно проводимых опыта с высвобождением препарата в культуральную среду: с нативной и отмытой инкапсулированными формами LFX. Сравнивая результаты двух опытов, можно уточнить кинетику выхода препарата в питательную среду. Например, ситуация быстрого бактериостатического эффекта, достигнутого при использовании среды, где инкубировали нативную инкапсулированную форму LFX, при отсутствии эффекта с аликвотами среды, в которой инкубировали отмытую инкапсулированную форму, будет свидетельствовать о том, что весь препарат (или большее его количество) располагался на поверхности полимера. При отсроченном бактериостатическом эффекте в опыте с отмывкой инкапсулированной формы по сравнению с нативной можно заключить, что определенная доля препарата при синтезе распределилась в полимер равномерно, а часть — поверхностно. В случае отсроченного бактериостатического эффекта в опыте без отмывки по сравнению с опытом с отмывкой носителя можно заключить, что препарат равномерно распределен в полимере и постепенно высвобождается (так как в опыт с отмывкой отбирали в 2 раза больше носителя с препаратом, то и эффект наступает раньше).

### Влияние диапазона концентраций LFX на динамику роста *M. tuberculosis* H37Rv

Для определения количества инкапсулированных форм LFX, необходимого для исследования кинетики высвобождения препарата в культуральной среде, было исследовано влияние ряда концентраций LFX на рост лабораторного штамма МБТ. Для этого стандартизированную культуру инкубировали с LFX в концентрации от 0,031 до 0,4 мкг/мл в системе BACTEC MGIT 960. В качестве контроля использовали культуру без добавления препарата (табл. 1). Было показано, что МИК LFX в отношении используемого в эксперименте штамма составила 0,25 мкг/мл. На основании полученных данных была построена зависимость доза–эффект (рисунок), которую использовали в дальнейшем для определения выхода LFX из полимерного носителя в культуральную среду.

### Исследование кинетики высвобождения LFX из биорезорбируемых полимеров в культуральной среде по оценке динамики роста культуры *M.tuberculosis* H37Rv

По описанному выше дизайну были исследованы инкапсулированные формы LFX в трех вариантах

Таблица 1. Рост культуры *M. tuberculosis* H37Rv в присутствии левофлоксацина

Концентрация LFX, мкг/мл	Начало роста культуры (дни), Среднее $\pm$ CO	Задержка начала роста культуры по сравнению с контролем, дни	Процент ингибиции роста
0 (контроль без препарата)	6,07 $\pm$ 0,06	–	–
0,03125	6,08 $\pm$ 0,12	нет	–
0,0625	6,20 $\pm$ 0,27	нет	–
0,125	7,69 $\pm$ 0,09	1,62	25
0,15	16,92 $\pm$ 1,14	10,85	90
0,20	24,76 $\pm$ 3,21	18,69	99
0,25	нет роста культуры		100
0,3	нет роста культуры		100
0,4	нет роста культуры		100

полимерных носителей — ПЛГ-матрикса и частиц размером 50 и 100 мкм. В качестве контроля использовали культуру МБТ без добавления препарата и культуру с добавлением проб среды, в которой культивировали интактный ПЛГ-матрикс (без включения LFX). Результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, при использовании в качестве носителя частиц ПЛГ размером 50 и 100 мкм обнаружен немедленный бактериостатический эффект в опыте с нативным носителем и отсроченный — в опыте с отмывкой носителя, из чего можно заключить, что большая часть LFX распределена по поверхности полимера (не менее 60%): уже через 3 ч инкубации неотмытого полимера в культуральную среду высвободилось количество препарата (0,15–0,20 мкг/мл), достаточное для ингибирования роста более 90% популяции микобактериальных клеток.

В случае с LFX, включенным в ПЛГ-матрикс, наоборот, отсроченный бактериостатический эффект был отмечен в опыте без отмывки носителя (на первый день с отмывкой и на 29-й день — без отмывки), что свидетельствует о том, что LFX достаточно равномерно распределен в матриксе и высвобождается постепенно. Кроме того, результат, полученный в опыте с отмывкой, показывает, что часть препарата была сосредоточена в приповерхностной области: был отмечен выход 25% LFX уже в первые сутки, что выражалось в подавлении роста 25% микобактериальных клеток, далее отмечено равномерное

высвобождение препарата до 50% к 45-м суткам (полное подавление роста культуры вследствие достижения МИК LFX, равного 0,25 мкг/мл).

Рост культуры с аликвотами среды, в которой инкубировали матрикс без препарата, не отличался от роста культуры без добавления препаратов, что говорит об адекватности разработанной модели.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработанная модель и проведенные экспериментальные исследования позволяют оценить кинетику высвобождения противотуберкулезных препаратов в культуральной среде по подавлению роста культуры *M. tuberculosis in vitro*. Ранее испытания антимикобактериальной активности *in vitro* проводили только для липосомных форм инкапсулированных препаратов, использование которых не подразумевало постепенного высвобождения препаратов, а лишь способствовало их доставке к очагу туберкулезной инфекции. При подобных испытаниях применяли классические схемы исследования *in vitro*, нацеленные на оценку эффективности действия инкапсулированных форм препарата по сравнению с чистой субстанцией и оценку непосредственного токсического действия оболочки липосомы на микобактерии [10–12]. Препараты с пролонгированным высвобождением в модели *in vitro* изучали в отношении бактерий, не относящихся к роду

Таблица 2. Ингибирование роста культуры *M. tuberculosis* H37Rv под действием высвободившегося из полимерного носителя LFX

Время инкубации	Ингибирование роста, %*						Концентрация LFX в среде**, мкг/мл (высвободилось препарата, %)					
	Частицы 50 мкм		Частицы 100 мкм		Матрикс		Частицы 50 мкм		Частицы 100 мкм		Матрикс	
	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм	б/отм	отм
1 ч	90	0	90	0	0	0	0,15 (60)	–	0,15 (60)	–	–	–
3 ч	90	0	99	0	0	0	0,15 (60)	–	0,20 (80)	–	–	–
1 сутки	99	0	99	0	0	25	0,20(80)	–	0,20 (80)	–	–	0,125 (25)
3 суток	99	0	99	0	0	25	0,20 (80)	–	0,20 (80)	–	–	0,125 (25)
7 суток	99	0	99	0	0	90	0,20 (80)	–	0,20 (80)	–	–	0,15 (30)
10 суток	99,9	50	99	0	0	90	0,225 (90)	0,135 (67,5***)	0,20 (80)	–	–	0,15 (30)
16 суток	99,9	50	99	0	0	99	0,225 (90)	0,135 (67,5)	0,20 (80)	–	–	0,2 (40)
22 суток	99,9	50	99	0	0	99	0,225 (90)	0,135 (67,5)	0,20 (80)	–	–	0,2 (40)
29 суток	99,99	75	99,99	25	25	99,9	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,125 (50)	0,225 (45)
45 суток	99,99	75	99,99	25	90	100	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,15 (60)	0,25 (50)
66 суток	99,99	75	99,99	25	99	100	0,235 (94)	0,145 (72,5)	0,235 (94)	0,09 (90)	0,2 (80)	0,25 (>50)

Примечание: \* — рассчитано по задержке начала роста культуры по сравнению с контролем без препарата; \*\* — определено согласно зависимости доза-эффект (см. рис.); \*\*\* — здесь и далее (в опытах с отмывкой матрикса): с учетом отмывки с поверхности препарата (% отмывки препарата = % препарата, вышедшего в среду за 3 ч в опыте без отмывки); б/отм — опыт без отмывки носителя от поверхностно расположенного LFX, отм — опыт с отмывкой носителя; – — количества выделившегося LFX недостаточно для достижения регистрируемого бактериостатического эффекта (меньше 0,125 мкг/мл).

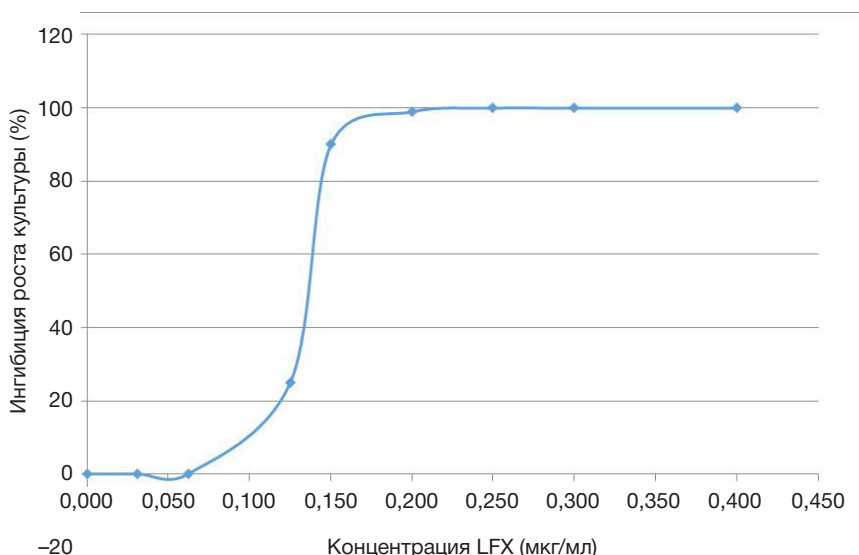


Рис. Залежність доза–ефект LFX в отношении лабораторного чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv

*Mycobacterium*, наприклад, на *Staphylococcus aureus*, з побудовою графіка залежності час–ефект при культивуванні бактерій в присутності полімерного носителя з інкапсульованим антибіотиком [13].

Антимікробне діяння інкапсульованих протитуберкульозних препаратів вивчали переважно в моделях *in vivo*. При випробуванні на моделях туберкульозу миші та кролика мікрочастиці на основі ПЛГ з включенням рифампіцину [14], ізоніазиду [15, 16], етионаміда [17], комбінації рифампіцину та ізоніазиду [18], рифампіцину та циклосерину [19] були показані їх висока протитуберкульозна активність, пролонгований ефект та зменшена токсичність порівняно з традиційними формами препаратів. Використання експериментальних тварин для випробування інкапсульованих препаратів пролонгованого діяння, з однієї сторони, суттєво спрощує практичну складову експерименту та інтерпретацію результату, так як тут використовують природну фармакокінетику звільненого з носителя препарату. З іншої сторони, модель *in vivo* через високі фінансові витрати на проведення експерименту (закупка та утримання лінійних тварин) та з етичних причин не дозволяє проводити скринінгові дослідження великої кількості носіїв та включених в них препаратів. Розробка моделей, що дозволяють оцінювати ріст культури *M. tuberculosis* при накопленні препарату в середі та під дією препарату, звільненого в середі за певний проміжок часу, дуже перспективна завдяки можливості випробування великої кількості комбінацій носитель–препарат для вибору найкращого варіанту та подальшого випробування *in vivo*.

Аналіз отриманих результатів дозволяє також відповісти на питання, чи потрібна попередня підготовка носителя з препаратом перед експериментом (потрібно мити від поверхнево розташованого препарату чи ні), та визначити необхідну кількість носителя з препаратом для експерименту *in vivo* з урахуванням попередньої підготовки та кінетики звільнення.

## ВИВОДИ

Розроблена модель *in vitro*, що дозволяє проводити скринінг інкапсульованих пролонгованих форм протитуберкульозних препаратів. Використання такого підходу для оцінки пролонгованих форм препаратів дозволяє вибрати найбільш перспективну композицію (мало поверхнево розташованого препарату, рівномірне звільнення на протязі всього терміну експерименту). Результати, отримані для трьох інкапсульованих форм LFX в біорезорбуючих полімерних носителях з ПЛГ, показали, що кінетика накоплення препарату в середі суттєво залежить від виду полімерного носителя та найбільш перспективний матрикс, який добре включає в себе LFX та достатньо рівномірно звільнює його при інкубації в середі.

В цілому, розроблена модель може бути корисною не тільки для скринінгу антимікобактеріальної активності інкапсульованого левофлоксацину, але й для скринінгу інкапсульованих форм інших ПЛГ. Проведення такого скринінгового дослідження перед випробуваннями *in vivo* дозволить суттєво знизити матеріальні витрати та, безсумнівно, більш прийнятно з точки зору біоетики.

## Література

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
2. Bogorodskii SE, Krotova LI, Mironov AV, Popov VK. Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices Using Supercritical Carbon Dioxide. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2013; 7 (8): 916–23.
3. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development Adv Drug Del Rev. 2007; 59: 546.
4. Антонов Е. Н., Богородский С. Э., Дунаев А. Г., Кротова Л. И., Марьянац А. О., Сячина М. А., и др. Разработка компонентов антибактериальных лекарственных форм пролонгованного действия с использованием СКФ-технологий. Сверхкритические флюиды: теория и практика. 2020; 15 (1): 124–35.

5. Yehia SA, Elshafeey AH, Elsayed I. A novel injectable in situ forming poly-DL-lactide and DL-lactide/glycolide implant containing lipospheres for controlled drug delivery. *J Liposome Res.* 2012; 22 (2): 128–38.
6. Ahmed T. Review: approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pak J Pharm Sci.* 2015; 28 (2): 657–65.
7. Эргешов А. Э., редактор. Туберкулез органов дыхания. Руководство для врачей. М.: Галлея-Принт, 2017; 524 с.
8. Черноусова Л. Н., Севастьянова Э. В., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Попов С. А. и др. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. Тверь: Триада, 2014; 29 с.
9. Matyugina E, Khandazhinskaya A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Chizhov A, et al. The synthesis and antituberculosis activity of 50-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2012; 20: 6680–86.
10. Bhardwaj A, Kumar L, Narang RK, Murthy RS. Development and characterization of ligand-appended liposomes for multiple drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013; 41 (1): 52–9.
11. Сорокоумова Г. М., Ясин Я. О. Х., Миколович Ю. Л., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Селищева А. А., и др. Создание и изучение свойств липосомальной формы левофлоксацина. Тонкие химические технологии. 2013; 8 (5): 72–6.
12. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Zhogina YA, Smirnova DI, Mikulovich YL, Sorokoumova GM, et al. Effect of exogenous cardiolipin on the growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in vitro. *Dokl Biol Sci.* 2010; 434: 371–4.
13. Qiao Z, Yuan Z, Zhang W, Wei D, Hu N. Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47 (1): 790–8.
14. Quenelle DC, Staas JK, Winchester GA, Barrow EL, Barrow WW. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (5): 1144–51.
15. Kailasam S, Daneluzzi D, Gangadharam PR. Maintenance of therapeutically active levels of isoniazid for prolonged periods in rabbits after a single implant of biodegradable polymer. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75 (5): 361–5.
16. Gangadharam PR, Kailasam S, Srinivasan S, Wise DL. Experimental chemotherapy of tuberculosis using single dose treatment with isoniazid in biodegradable polymers. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33 (2): 265–71.
17. Kumar G, Malhotra S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Sharma S. In vitro physicochemical characterization and short term in vivo tolerability study of ethionamide loaded PLGA nanoparticles: potentially effective agent for multidrug resistant tuberculosis. *J Microencapsul.* 2011; 28 (8): 717–28.
18. Dutt M, Khuller GK. Therapeutic efficacy of Poly(DL-lactide-Co-Glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (1): 363–6.
19. Найденнова А. А., Сукоян Г. В., Воронцов Е. А., Кузнецов С. Л., Гукасова Н. В., Рябцева М. С. и др. Разработка наносомальных композиций рифампицина и D-циклосерина на основе полилактидгликолидов и исследование их противотуберкулезной активности. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012; 3 (12): 23–30.

## References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
2. Bogorodskii SE, Krotova LI, Mironov AV, Popov VK. Fabrication of highly porous bioresorbable polymer matrices Using Supercritical Carbon Dioxide. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2013; 7 (8): 916–23.
3. Alsenz J, Kansy M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development *Adv Drug Del Rev.* 2007; 59: 546.
4. Antonov EN, Bogorodskiy SE, Dunayev AG, Krotova LI, Mariyanats AO, Syachina MA, i dr. Razrabotka komponentov antibakterial'nykh lekarstvennykh form prolongirovannogo deystviya s ispol'zovaniyem SKF-tekhnologiy. *Sverkhkriticheskiye fluidy: teoriya i praktika.* 2020; 15 (1): 124–35. Russian.
5. Yehia SA, Elshafeey AH, Elsayed I. A novel injectable in situ forming poly-DL-lactide and DL-lactide/glycolide implant containing lipospheres for controlled drug delivery. *J Liposome Res.* 2012; 22 (2): 128–38.
6. Ahmed T. Review: approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pak J Pharm Sci.* 2015; 28 (2): 657–65.
7. Ergeshov AE, editor. *Tuberkulez organov dykhaniya. Rukovodstvo dlya vrachey.* M.: Galleya-Print, 2017; 524 s. Russian.
8. Chernousova LN, Sevastyanova EV, Larionova EE, Smirnova TG, Andreevskaya SN, i dr. Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza. *Tver': Triada,* 2014; 29 s.
9. Matyugina E, Khandazhinskaya A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Chizhov A, et al. The synthesis and antituberculosis activity of 50-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2012; 20: 6680–86.
10. Bhardwaj A, Kumar L, Narang RK, Murthy RS. Development and characterization of ligand-appended liposomes for multiple drug therapy for pulmonary tuberculosis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2013; 41 (1): 52–9.
11. Sorokoumova GM, Yasin YaOH, Mikulovich YuL, Smirnova TG, Andreevskaya SN, Selishcheva AA, i dr. Sozdaniye i izucheniye svoystv liposomal'noy formy levofloksatsina. *Tonkiye khimicheskiye tekhnologii.* 2013; 8 (5): 72–6. Russian.
12. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Zhogina YA, Smirnova DI, Mikulovich YL, Sorokoumova GM, et al. Effect of exogenous cardiolipin on the growth and viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in vitro. *Dokl Biol Sci.* 2010; 434: 371–4.
13. Qiao Z, Yuan Z, Zhang W, Wei D, Hu N. Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47 (1): 790–8.
14. Quenelle DC, Staas JK, Winchester GA, Barrow EL, Barrow WW. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (5): 1144–51.
15. Kailasam S, Daneluzzi D, Gangadharam PR. Maintenance of therapeutically active levels of isoniazid for prolonged periods in rabbits after a single implant of biodegradable polymer. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75 (5): 361–5.
16. Gangadharam PR, Kailasam S, Srinivasan S, Wise DL. Experimental chemotherapy of tuberculosis using single dose treatment with isoniazid in biodegradable polymers. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33 (2): 265–71.
17. Kumar G, Malhotra S, Shafiq N, Pandhi P, Khuller GK, Sharma S. In vitro physicochemical characterization and short term in vivo tolerability study of ethionamide loaded PLGA nanoparticles: potentially effective agent for multidrug resistant tuberculosis. *J Microencapsul.* 2011; 28 (8): 717–28.
18. Dutt M, Khuller GK. Therapeutic efficacy of Poly(DL-lactide-Co-Glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (1): 363–6.
19. Naydenova AA, Sukoyan GV, Vorontsov EA, Kuznetsov SL, Gukasova NV, Ryabtseva MS, i dr. Razrabotka nanosomal'nykh kompozitsiy rifampitsina i D-tsikloserina na osnove polilaktidglikolidov i issledovaniye ikh protivotuberkuleznoy aktivnosti. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2012; 3 (12): 23–30. Russian.

## АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ МОСКВЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Д. А. Каштанова<sup>1,2</sup>✉, Н. С. Клименко<sup>3</sup>, И. Д. Стражеско<sup>1</sup>, О. Н. Ткачева<sup>1</sup>, Е. В. Старикова<sup>4</sup>, О. Е. Глущенко<sup>4</sup>, Д. А. Гудков<sup>4</sup>, Е. Н. Ильина<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биологии гена, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Старение населения ставит перед медицинским обществом задачу изучения здорового долголетия, предрасполагающих к нему биомаркеров и характерных особенностей. В настоящей работе рассмотрен один из таких факторов — микробиота кишечника. Целью исследования было изучить состав микробиоты кишечника долгожителей и провести сравнительный анализ с группой относительно здоровых более молодых лиц, проживающих на территории г. Москвы. В одномоментное исследование были включены 20 человек в возрасте 97–100 лет, средний возраст  $98 \pm 1$  год, в качестве группы сравнения была выбрана группа из 92 человек  $53 \pm 13$  лет. Для участников исследования обеих групп проводили секвенирование V3–V4 варибельных участков гена 16S рРНК микробиоты кишечника. Для первичного анализа, фильтрации ридов и идентификации операционных таксономических единиц использовали QIIME 1.9, для реконструкции метаболических путей — алгоритм PICRUSt. Статистический анализ проводили с использованием языка Python v. 3.2. При межгрупповом сравнении были обнаружены значимые различия в микробиоте долгожителей и относительно здоровых лиц: в составе микробиоты первых были достоверно более представлены *Bifidobacterium* ( $p = 0,026$ ) и *Coprococcus eutactus* ( $p = 0,026$ ), в то время как у относительно здоровых лиц выявлено больше *Bacteroides* ( $p = 0,003$ ) и *Prevotella* ( $p = 0,002$ ). Потенциал синтеза масляной кислоты был выше в группе долгожителей ( $p = 0,048$ ). Состав микробиоты кишечника долгожителей оказался неожиданно благополучным, с большей представленностью полезных бактерий. Кроме того, можно говорить о возможном наличии у долгожителей более выраженного «противовоспалительного» потенциала микробиоты кишечника ввиду лучшей способности микробиоты синтезировать масляную кислоту.

**Ключевые слова:** микробиота кишечника, долголетие, масляная кислота, старение, системное вялотекущее воспаление

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 19-34-80033

**Вклад авторов:** Д. А. Каштанова — дизайн исследования, набор пациентов, интерпретация данных, написание статьи; Н. С. Клименко — биоинформатический анализ, интерпретация данных, написание статьи; И. Д. Стражеско — концептуализация исследования, редактирование статьи; О. Н. Ткачева — концептуализация и дизайн исследования; Е. В. Старикова — анализ микробиоты кишечника, редактирование статьи; О. Е. Глущенко, Д. А. Гудков — анализ микробиоты кишечника; Е. Н. Ильина — финальное редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 2 от 18 марта 2016 г.). Все участники подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Дарья Андреевна Каштанова  
ул. 1-я Леонова, д. 16, г. Москва, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

**Статья получена:** 01.07.2020 **Статья принята к печати:** 15.07.2020 **Опубликована онлайн:** 26.07.2020

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2020.044

## GUT MICROBIOTA ASSESSMENT IN MOSCOW LONG-LIVERS USING NEXT GENERATION SEQUENCING

Kashtanova DA<sup>1,2</sup>✉, Klimentko NS<sup>3</sup>, Strazhesko ID<sup>1</sup>, Tkacheva ON<sup>1</sup>, Starikova EV<sup>4</sup>, Glushchenko OE<sup>4</sup>, Gudkov DA<sup>4</sup>, Iliina EN<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Center for Strategic Planning of FMBA, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

Demographic aging poses a challenge to the medical community, pressing for research into the biological factors promoting longevity and its features. Below, we look at the gut microbiota as one of such factors. The aim of this non-longitudinal study was to profile the gut microbiota of centenarians and to compare it with that of relatively healthy, younger Moscow residents. The study recruited 20 people aged 97–100 years (mean age  $98 \pm 1$  year); the control group consisted of 92 individuals aged  $53 \pm 13$  years. For each stool sample, the variable V3–V4 regions of the microbial 16S rRNA gene were sequenced. Primary analysis, read filtering and taxonomic identification were conducted in the QIIME 1.9 environment; reconstruction of metabolic pathways was aided by PICRUSt. Statistical analysis was performed by means of Python v. 3.2. A few differences were detected between the gut microbiota of centenarians and younger individuals: *Bifidobacterium* ( $p = 0.026$ ) and *Coprococcus eutactus* ( $p = 0.026$ ) were more abundant in centenarians, whereas *Bacteroides* ( $p = 0.003$ ) and *Prevotella* ( $p = 0.002$ ) were better represented in younger participants. The potential for butyric acid synthesis was higher in the group of centenarians ( $p = 0.048$ ). Surprisingly, the gut microbiota of centenarians was more diverse and surprisingly beneficial for advanced age. Besides, the gut microbiota of centenarians might have more pronounced anti-inflammatory potential due to its ability to better synthesize butyric acid.

**Keywords:** gut microbiota, longevity, butyric acid, aging, systemic low-grade inflammation

**Funding:** the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant 19-34-80033).

**Author contribution:** Kashtanova DA — study design, participant recruitment, data interpretation, manuscript preparation; Klimentko NS — bioinformatic analysis, data interpretation, manuscript preparation; Strazhesko ID — study concept, manuscript revision; Tkacheva ON — study concept and design; Starikova EV — gut microbiota profiling, manuscript revision; Glushchenko OE, Gudkov DA — gut microbiota profiling; Iliina EN — final revision of the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 2 dated March 18, 2016). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Daria A. Kashtanova  
1-ya Leonova, 16, Moscow, 129226; dr.kashtanova@gmail.com

**Received:** 01.07.2020 **Accepted:** 15.07.2020 **Published online:** 26.07.2020

**DOI:** 10.24075/brsmu.2020.044