

УДК 615.33.015.8:547.992:546.57-022.532
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-55-64>

Восстановление антибиотикочувствительности к линкомицину в составе композиций с наносеребром и гуминовыми веществами

Зыкова М.В.¹, Чжан Ю.², Лысенко И.В.³, Арутюнян Д.А.², Азаркина Л.А.¹, Михалев Д.А.¹, Белоусов М.В.¹, Перминова И.В.³

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Московский государственный университет (МГУ) им. М.В. Ломоносова
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1-3

³ Южно-Уральский государственный медицинский университет (ЮУГМУ)
Россия, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

РЕЗЮМЕ

Цель – исследование восстановления чувствительности метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* к линкомицину при добавлении гуминовых веществ с наночастицами серебра.

Материалы и методы. Композиции гуминовых веществ с наночастицами серебра синтезировали из коммерческого гумата натрия Powhitmus и нитрата серебра в присутствии NaOH (1 моль) для создания щелочной среды. Для синтеза одной из двух композиций гумат натрия модифицировали гидрохиноном. Для описания характеристик полученных составов снимали спектры поверхностного плазмонного резонанса наночастиц серебра и их изображения, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. Чувствительность клинического штамма *Staphylococcus aureus*, устойчивого к метициллину, определяли, измеряя минимальную ингибирующую концентрацию (МИК), с введением в состав композиций линкомицина и тетрациклина.

Результаты. Показана 100%-я конверсия ионного серебра в металлическое с характерным размером наночастиц 6 нм. Проведено сравнение действия тетрациклина и линкомицина на исследуемый штамм *S. aureus*, показаны высокая чувствительность к тетрациклину (МИК < 10 мкг/мл) и отсутствие чувствительности к линкомицину (МИК > 200 мкг/мл). Исследование действия композиции гуматов натрия с наносеребром при введении в них линкомицина показало, что подобный подход позволяет существенно снизить МИК линкомицина до 0,1 мкг/мл в присутствии композиций с модифицированным гидрохиноном гумата натрия в концентрации 40 мкг/мл и композиций с немодифицированным гуматом натрия в концентрации 60 мкг/мл.

Заключение. В проведенном исследовании продемонстрировано, что при использовании композиций гуминовых веществ с наносеребром происходит полное восстановление чувствительности к линкомицину устойчивого к метициллину штамма *Staphylococcus aureus*.

Ключевые слова: наночастицы серебра, гуминовые вещества, линкомицин, синергетический эффект, антибиотикорезистентность, *Staphylococcus aureus*

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФ № 20-63-47070 (синтез композиций наносеребра с гуминовыми веществами и комбинированных препаратов с антибиотиками) и гранта РФ 20-65-47052 (определение антимикробной активности). Исследование наночастиц было выполнено в Центре коллективного пользования «Нанохимия и наноматериалы» на оборудовании (просвечивающим микроскопе), приобретенном на средства программы МГУ «Развитие».

✉ Перминова Ирина Васильевна, iperminova@gmail.com

Для цитирования: Зыкова М.В., Чжан Ю., Лысенко И.В., Арутюнян Д.А., Азаркина Л.А., Михалев Д.А., Белоусов М.В., Перминова И.В. Восстановление антибиотикочувствительности к линкомицину в составе композиций с наносеребром и гуминовыми веществами. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(2):55–64. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-55-64>.

Restoring antibiotic sensitivity to lincomycin in compositions with nanosilver and humic substances

Zykova M.V.¹, Zhang Yun², Lysenko I.V.³, Arutyunyan D.A.², Azarkina L.A.¹, Mikhalev D.A.¹, Belousov M.V.¹, Perminova I.V.³

¹ Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University

1-3, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation

³ South Ural State Medical University

64, Vorovskogo Str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the effect of compositions with nanosilver and humic substances on restoration of sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to lincomycin.

Materials and methods. Compositions of humic substances with silver nanoparticles were synthesized from commercial sodium humate Powhumus and silver nitrate in the presence of NaOH (1 M) to modulate alkaline pH. To synthesize one of the two compositions, sodium humate was modified with hydroquinone. To describe the characteristics of the resulting compositions, surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles and their images obtained by transmission electron microscopy were recorded. Sensitivity of a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was determined by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) with the addition of lincomycin and tetracycline to the compositions.

Results. 100% conversion of ionic silver into metallic silver with a characteristic nanoparticle size of 6 nm was shown. The effects of tetracycline and lincomycin on the studied strain of *Staphylococcus aureus* were compared, and high sensitivity to tetracycline (MIC < 10 µg / ml) and resistance to lincomycin (MIC > 200 µg / ml) were shown. Studying the effect of the composition containing sodium humates with nanosilver with the introduction of lincomycin into it showed that this approach can significantly reduce MIC of lincomycin to 0.1 µg/ml in the presence of compositions with hydroquinone-modified sodium humate at a concentration of 40 µg / ml and compositions with unmodified sodium humate at a concentration of 60 µg / ml.

Conclusion. The study demonstrated that the use of compositions with humic substances and nanosilver completely restores sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to lincomycin.

Keywords: silver nanoparticles, humic substances, lincomycin, synergistic effect, antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation Grant No. 20-63-47070 (synthesis of compositions with nanosilver and humic substances and combination drugs with antibiotics) and the Russian Science Foundation Grant No. 20-65-47052 (determination of antimicrobial activity). The study of nanoparticles was carried out at the Center for Collective Use “Nanochemistry and Nanomaterials” using the equipment (a transmission microscope) purchased with Moscow State University Development program funds.

For citation: Zykova M.V., Zhang Yun, Lysenko I.V., Arutyunyan D.A., Azarkina L.A., Mikhalev D.A., Belousov M.V., Perminova I.V. Restoring antibiotic sensitivity to lincomycin in compositions with nanosilver and humic substance. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(2):55–64. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-2-55-64>.

ВВЕДЕНИЕ

После открытия в 1928 г. А. Флемингом первого антибиотика пенициллина в 1942 г. было показано активное развитие резистентных к препарату штаммов *Staphylococcus aureus* [1]. Рост количества резистентных к пенициллину штаммов с течением времени привел к необходимости разработки новых антибиотиков, что повлекло за собой возникновение новых полирезистентных микроорганизмов [2]. Данная проблема заставила думать о способах усиления действия уже имеющихся антибиотиков [3]. Особое внимание привлекли к себе наночастицы серебра, которые давно известны своими антибактериальными свойствами [4]. При этом к металлическим частицам резистентность формируется гораздо медленнее, чем к антибиотикам [5].

Многочисленные эксперименты по изучению антибактериальной активности композиций наносеребра и антибиотиков показали, что наносеребро способно не только усиливать действие антибиотиков на бактерии [6], но и в некоторых случаях приводит к восстановлению чувствительности к антибиотикам у резистентных штаммов бактерий [7, 8]. Ранее было показано, что применение наночастиц вместе с широким рядом антибиотиков позволяет в ряде случаев создать синергетический антибактериальный эффект действия обеих составляющих композиции против различных грамположительных бактерий. Для *Bacillus cereus* отмечено, что в присутствии наночастиц серебра чувствительность бактерий к линкомицину возрастает в 4 раза [9]; для *Enterococcus faecium* увеличение чувствительности к ампициллину составляет 16, амикацину – 32 раза [10]. Также существенное влияние на антибактериальную активность оказывают форма и размер синтезируемых наночастиц [11].

При этом основной проблемой применения наночастиц (НЧ) серебра в клинической практике является потенциальное усиление цитотоксичности таких композиций. Задача усугубляется отсутствием понимания точного механизма действия подобных композиций [12, 13]. Предполагается, что они могут формировать повышенные концентрации ионов Ag вблизи клеточной стенки бактерий, оказывая цитотоксический эффект [14], индуцировать скорость формирования гидроксильного радикала [15], влиять на процесс транскрипции ДНК [16].

Исследования по биологической активности нативных и модифицированных гуминовых веществ (ГВ) показывают, что они представляют большой потенциал для включения в композиции на основе НЧ вследствие обилия свойств и молекулярного со-

става [17–19]. Особенно перспективным представляется применение ГВ для получения наночастиц Ag без добавления других восстановителей, как описано в литературе [20–23] и в наших публикациях [24]. Мы показали, что это позволяет получить препараты НЧ с хорошим профилем безопасности, что связано с высокой антиоксидантной активностью и низкой цитотоксичностью ГВ [24]. Особый интерес в контексте получения новых комбинированных препаратов для преодоления антибиотикорезистентности имеет введение антибиотиков в состав композиций AgНЧ-ГВ. Различные механизмы взаимодействия ГВ с широким спектром антибиотиков были рассмотрены в нашей обзорной статье [25]. Ожидалось, что связывание антибиотика с гуминовыми лигандами на поверхности наночастиц серебра может способствовать его попаданию в клетку вместе с AgНЧ.

При выборе антибиотиков мы руководствовались нашей главной целью – создание бионаноматериалов для лечения инфицированных ран, в котором большую роль играет применение мягких форм – мазей, гелей и т.п. Поэтому антибиотик должен обладать способностью проникать в мягкие ткани и костную ткань для лечения хронических вялотекущих гнойно-воспалительных процессов, таких как пролежни и диабетическая стопа. Этим требованиям удовлетворяют пенициллины, линкозамиды, фторхинолоны, аминогликозиды, тетрациклины и т.д. Антибиотик должен хорошо смешиваться с липофильными мазевыми основами для использования в мягких наружных формах. Данному требованию удовлетворяют только мази с линкомицином и тетрациклином, поскольку пенициллины не используются наружно, левофлоксацин (фторхинолоны) применяется в виде водного спрея, а неомицин (аминогликозиды) – в виде аэрозольной суспензии. Поэтому мы остановили свой выбор на двух антибиотиках – линкомицине и тетрациклине, резистентность к которым имеет библиотечный штамм метициллин-резистентного золотистого стафилококка (МРЗС) *Staphylococcus aureus*.

Выбор штамма был обусловлен тем, что МРЗС является одной из наиболее распространенных и опасных форм золотистого стафилококка, вызывающей множество заболеваний, включая инфекции кровотока, пневмонию, инфекции кожи и костей. Также МРЗС обладает высокой устойчивостью к большинству антибиотиков, что делает его более сложным для лечения и контроля. Немаловажно, что данный штамм хорошо изучен и описан во многих литературных источниках, что позволяет проводить более глубокие и точные исследования. Более детальное изучение перспективных

комбинаций на других штаммах планируется на следующих этапах.

Цель данной работы состояла в изучении чувствительности метициллин-резистентного золотистого стафилококка к антибиотикам линкомицину и тетрациклину в составе композиций наносеребра, стабилизированного гуминовыми веществами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и реагенты. Гидроксид натрия (Kemphasol), нитрат серебра (Molychem), гушат натрия Powhumus (Humintech, Германия), клинический штамм *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (штамм F-182). Кислотность растворов измеряли с помощью рН-метра 713 рН Meter (Metrohm, Швейцария), оснащенного универсальным стеклянным электродом.

Синтез композиций проводили по методике, описанной в указанной работе [24]. Для синтеза готовили водный раствор гушата натрия и гидрохинон-производных этого препарата с концентрацией 11,8 г/л. Полученный раствор гушата доводили до рН 12, добавляя по каплям 1 моль NaOH при постоянном перемешивании. Затем 50 мл раствора помещали в трехгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, оснащенную обратным холодильником и термопарой, и нагревали до 80 °С при постоянном перемешивании. При достижении 80 °С по каплям вносили 2 мл раствора AgNO₃ с концентрацией 110 г/л, поддерживая рН на уровне 12 с помощью 1 моль NaOH. После этого раствор продолжали нагревать при температуре 80 °С и перемешивании в течение 4 ч. Общая концентрация серебра в полученном растворе составляла 41 ммоль/л.

Анализ полученных композиций наносеребра и гуминовых веществ. Полученные композиции гуминовых веществ с наночастицами серебра были изучены методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Эксперимент проводился с использованием микроскопа JEOLJEM-2100F (JEOL, Akishima, Япония). Обработку полученных результатов проводили при помощи программы ImageJ. Морфологию и размер частиц анализировали для обеих композиций.

Общую концентрацию серебра измеряли при помощи метода атомной эмиссионной спектроскопии индуктивно-связанной плазмы (ICP-AES) с использованием спектрометра ICPAES 720-ES (Agilent Technologies, США). Спектры УФ-видимого поглощения регистрировали для подтверждения присутствия наночастиц серебра, которые детектировали по появлению пика поверхностного плазмонного резонанса в диапазоне длин волн 400–430 нм для наночастиц серебра. Спектры поглощения измеряли при

помощи UV/Vis спектрометра (Cary 50 Probe, США). Результаты УФ-спектроскопии и ИСП-АЭС сравнивали для определения степени конверсии ионного серебра в металлическое.

Определение минимальной ингибирующей концентрации клинического штамма МРЗС проводили в 96-луночных планшетах при использовании неагаризованной питательной среды Мюллера – Хинтона. Для определения МИК в каждую лунку добавляли требуемый объем 0,9%-го раствора NaCl и 0,142 мл питательной среды, содержащей соответствующие концентрации антибиотика линкомицина в составе композиций гуминовых веществ с НЧ серебра. Диапазон результирующих концентраций составил 0,1–20 мкг/мл для линкомицина и 0–150 мкг/мл для композиций гуминовых веществ с НЧ серебра. Колонии МРЗС предварительно инкубировали при 35 °С в неагаризованной питательной среде Мюллера – Хинтона в течение 12 ч. В каждую лунку добавляли по 0,025 мл бактериальной взвеси, доведенной до 2 МЕ по Мак-Фарланду и проводили анализ на микропланшетном фотометре Immuno Chem-2100 (High Technology Inc., США) при длине волны 630 нм в течение 24 ч. Контролем служили среды без добавления исследуемых веществ, куда также вносили бактериальную взвесь.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием пакета статистической обработки данных SPSS (версия 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, США) с определением средней величины, ошибки средней величины и вероятности различий *p* для малых выборок с поправкой по Бонферрони (достоверность при значениях *p* < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что в ходе синтеза композиций гуминовых веществ с наночастицами серебра происходит 100%-я конверсия ионного серебра в металлическое с характерным средним размером сферических наночастиц 6 нм. Полученные композиции характеризуются концентрацией ГВ 11,8 г/л и концентрацией наносеребра 4,6 г/л (43 ммоль). Спектры поверхностного плазмонного резонанса (ППР) наночастиц серебра и их ПЭМ-изображения приведены на рис. 1.

Использованные в работе наночастицы серебра имеют характеристичный спектр поглощения с интенсивным пиком ППР, максимум которого находится на отметке 414 нм, что указывает на малый размер синтезированных наночастиц (рис. 1, *a*). Это подтверждается ПЭМ-изображением (рис. 1, *b*), которое показывает, что средний размер НЧ серебра в исследуемом препарате составлял 6–7 нм. Размер

наночастиц особенно важен для их биологической активности. Так, считается, что максимальной биологической активностью обладают наночастицы серебра с размерами меньше 10 нм [13]. Результа-

ты исследования показывают, что синтезированный препарат наносеребра, стабилизированного гуминовыми макролигандами, полностью удовлетворяет этому условию.

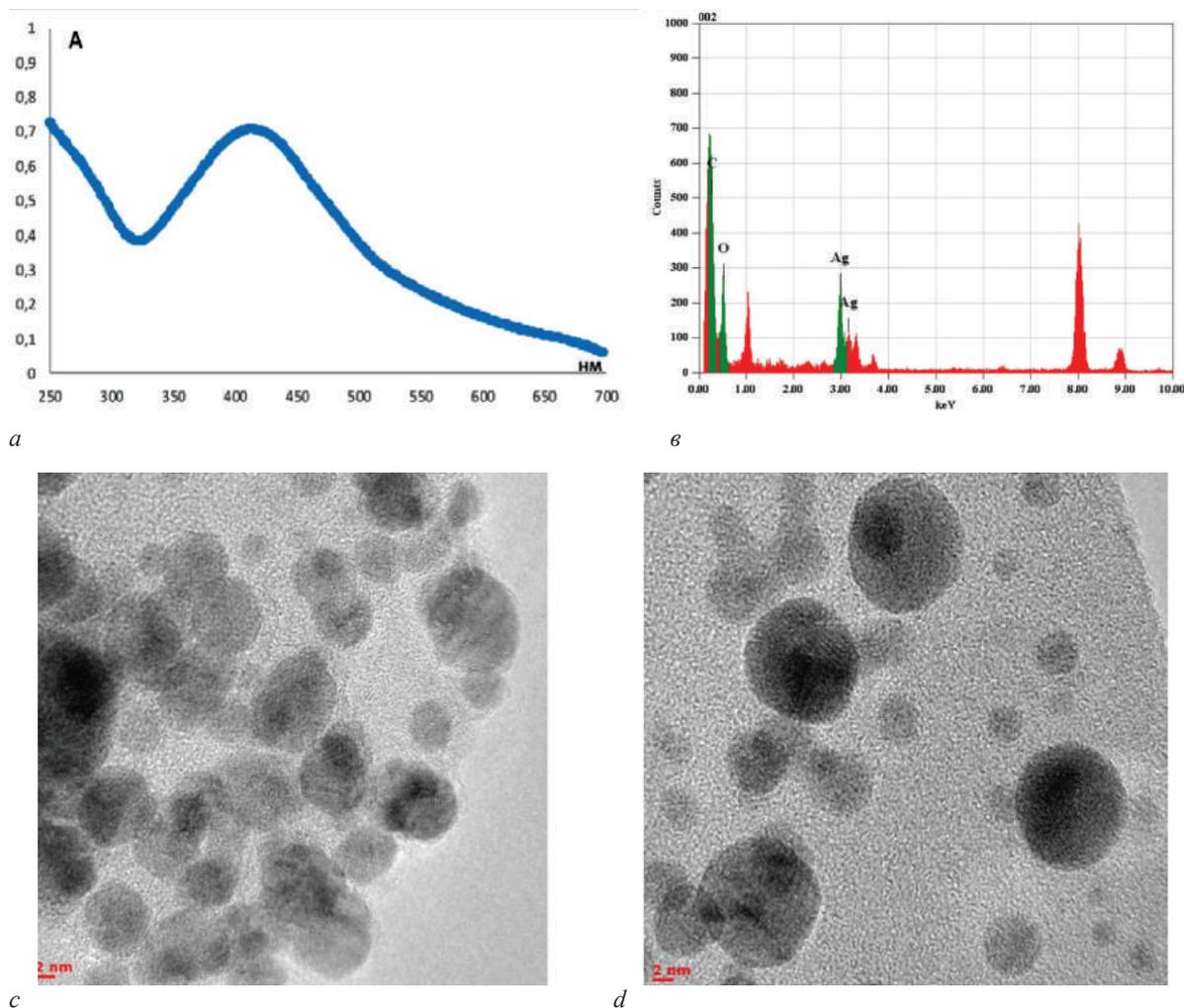


Рис. 1. Характеристика наночастиц серебра, синтезированных в среде гуминовых кислот угля (СНР): *a* – УФ-видимый спектр поглощения композиции с пиком ППР при 414 нм; *b* – карта распределения элементов по подложке ТЭМ; *c*, *d* – ПЭМ-изображения наночастиц серебра, стабилизированных ГВ

На первом этапе эксперимента было исследовано влияние матрицы ГВ на антибактериальную активность тетрациклина и линкомицина. Показано, что исследуемый штамм не обладает резистентностью к тетрациклину: антибиотик ингибирует рост бактерий во всем диапазоне исследованных концентраций. Линкомицин же не подавлял рост бактерий в широком диапазоне концентрации ГВ (0–1 500 мкг/мл) и линкомицина (10–200 мкг/мл).

Далее было проверено влияние наносеребра, синтезированного в среде исходного препарата ГВ и препарата, модифицированного гидрохиноном. Показано отсутствие эффекта изменения чувствительности

к антибиотику для композиций с тетрациклином и восстановление чувствительности к линкомицину в присутствии немодифицированной композиции (ГВ > 0 мкг/мл) и модифицированной гидрохиноном композиции (ГВ > 200 мкг/мл) во всем диапазоне исследуемых концентраций антибиотика. Вследствие этого было принято решение провести исследование свойств композиций с линкомицином, где наблюдалось восстановление чувствительности.

Антибактериальный эффект композиции наночастиц серебра, синтезированных в среде ГВ, изучали в отсутствие или присутствии линкомицина по отношению к МРЗС. Было протестировано пода-

вление роста клинических штаммов композициями наносеребра, стабилизированного исходными ГВ и их гидрохинон-производными в диапазоне концентрации 20–150 мкг/мл и линкомицином в диапазоне

концентрации 0,1–20 мкг/мл. Показан эффект повышения восстановления чувствительности бактерий к линкомицину для тестируемых композиций (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1

Изменение оптической плотности за 24 ч при измерении МИК композиций наночастиц серебра с модифицированными гуминовыми веществами и линкомицином в отношении клинического штамма МРЗС, мг/л														
Концентрация линкомицина	Концентрация модифицированных гидрохиноном гуматов натрия,							Концентрация немодифицированных гуматов натрия						
	0	20	40	60	80	100	150	0	20	40	60	80	100	150
0,1	0,5	0,4	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0	0	0	0
0,2	0,4	0,2	0	0	0	0	0	0,3	0,3	0,4	0	0	0	0
0,5	0,5	0,2	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,4	0	0	0	0
1	0,4	0,3	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,4	0	0	0	0
2	0,5	0,3	0	0	0	0	0	0,3	0,4	0,4	0	0	0	0
5	0,5	0,3	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0	0	0	0
10	0,5	0,3	0	0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0	0	0	0
20	0,5	0,4	0	0	0	0	0	0,4	0,3	0,4	0	0	0	0

Примечание. Полу жирным выделены случаи статистически значимого подавления роста клинического штамма МРЗС в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

В случае применения линкомицина или композиции ГВ с линкомицином в отсутствие наночастиц серебра МИК составляла более 200 мкг/мл, в случае использования тройной композиции в концентрации от 40 мкг/мл (для исходных ГВ) и от 20 мкг/мл (для

гидрохинон-модифицированных) значение МИК снижалось до 0,1 мкг/мл (см. рис. 2). Таким образом, наблюдалось существенное подавление роста патогенных бактерий по сравнению с использованием композиции гуминовых веществ с линкомицином.

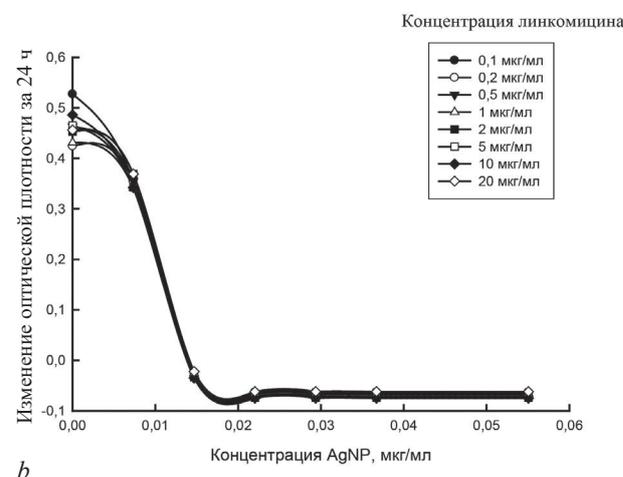
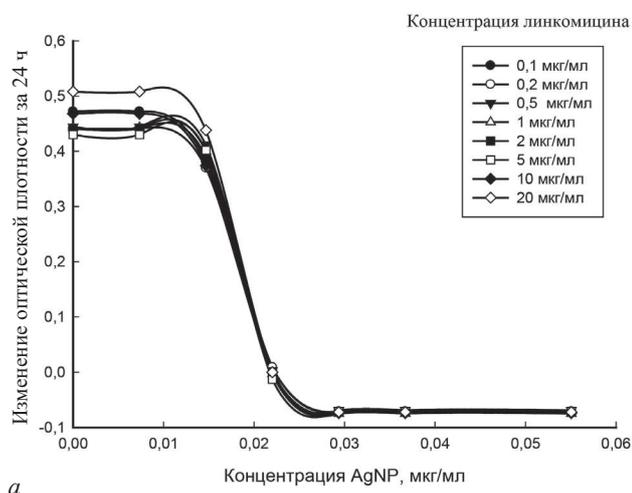


Рис. 2. Зависимость изменения оптической плотности концентрации наночастиц серебра в течение 24 ч для концентрации линкомицина в диапазоне 0,1–20 мкг/мл в композиции с немодифицированными гуминовыми веществами (a), гуминовыми веществами, модифицированными гидрохиноном (b)

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм действия линкомицина связан с подавлением биосинтеза белка путем связывания с А-сайтом 23S рРНК 50S-субъединицы рибосомы и, следовательно, препятствием связывания тРНК и нарушением процесса трансляции [26]. Механизм по-

явления антибиотикорезистентности к линкомицину подробно описан в указанной работе [27] и может быть связан с инактивацией антибиотика ферментами [28], мутациями эффлюкс-помпы MFS [29], модификацией сайта связывания 23S рРНК метилтрансферазами [30] или мутацией 50S-субъединицы рибосомы. Хотя механизм действия композиций

антибиотиков с наночастицами серебра на данный момент не определен точно. Показано, что их применение может представлять существенный интерес в борьбе с таким микроорганизмом, как *Staphylococcus aureus* [31, 32].

Клинический штамм *Staphylococcus aureus* F-182 является примером классической грамположительной бактерии, использующейся для исследования разнообразных антибактериальных композиций [33]. В геноме данного штамма находятся гены *NorB* и *ErmY*, отвечающие за модификацию эффлюкс-помпы MFS и метилирование сайта связывания линкомицина 23S рРНК соответственно. Таким образом, можно говорить о том, что синтезированные композиции позволяют преодолеть так называемую MLS_b -резистентность к линкозидам, присут-

ствующую у данного штамма. МИК исследуемого штамма МРЗС АТСС 43300 линкомицином составляла менее 0,1 мкг/мл в присутствии 40 мкг/мл нативных ГВ и 20 мкг/мл гидрохинонных производных ГВ, в отсутствие же исследуемой композиции – более 200 мкг/мл.

Полученные значения для МИК наносеребра, найденные в настоящей работе, приведены в табл. 2: они составили 0,022 и 0,015 мкг/мл для исходных и модифицированных гидрохиноном ГВ соответственно. Сравнение этих данных с литературными указывает, что они на порядок превосходят аналогичные показатели как для инженерных наночастиц, стабилизированных различными лигандами, так и для наночастиц, синтезированных различными микроорганизмами (см. табл. 2).

Таблица 2

Сравнение результатов определения МИК в присутствии исследуемых композиций с литературными данными

Антибактериальный агент	Размер НЧ, нм	Микроорганизм	МИК, мкг/мл			Источник
			Линкомицин	AgНЧ	ГВ	
Линкомицин	–	МРЗС АТСС 43300	>200	–	–	Настоящая работа
Гумат + линкомицин	–	МРЗС АТСС 43300	>200	–	>1 500	Настоящая работа
Гумат + AgНЧ + линкомицин	6,0	МРЗС АТСС 43300	<0,1	0,022	40	Настоящая работа
Гумат HQ + AgНЧ + линкомицин	6,0	МРЗС АТСС 43300	<0,1	0,015	60	Настоящая работа
Лигнин + AgНЧ	20,0	Multidrug resistant <i>S. aureus</i>	–	10	–	[34]
Дендример-инкапсулированные AgНЧ	3,3	<i>S. aureus</i> USA 300	–	128	–	[34]
Полистиренсульфонатные частицы со встроенными AgНЧ	5,0	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	–	1,14	–	[34]
AgНЧ, синтезированные с инфузией <i>Dracocephalum kotshyi</i>	19,0	МРЗС АТСС 43300	–	15,6	–	[34]
AgНЧ, синтезированные с инфузией <i>Artemisia haussknechtii</i>	10,7	МРЗС АТСС 43300	–	10,0	–	[34]
AgНЧ, полученные из морских <i>Streptomyces ssp.</i>	13,5	МРЗС АТСС 43300	–	0,039	–	[34]
AgНЧ, иммобилизованные на сополимере	25,0	МРЗС АТСС 43300	–	0,54	–	[34]

Обнаруженный эффект развивает идеи применения наночастиц серебра [35] и их композиций [36] на клинические штаммы, представляющие существенную опасность для жизни человека. Более того, он показывает существенное преимущество предложенного подхода к преодолению антибиотикорезистентности грамположительных бактерий путем применения тройных композиций гуминовых веществ с наночастицами и антибиотиками. Несмотря на то, что похожие результаты были достигнуты для композиций антибиотиков с наночастицами серебра [37] и наночастицами других металлов [38], исследования, представленные в этой работе, имеют осо-

бое значение для повышения профиля безопасности композиций на основе наносеребра ввиду биофильных свойств ГВ [24] и выполнены впервые. Более того, успешное восстановление чувствительности к антибиотикам является существенным открытием в области борьбы с антибиотикорезистентностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые продемонстрирован эффект восстановления чувствительности штамма *Staphylococcus aureus*, резистентного к метициллину, к линкомицину в присутствии композиций наносеребра, синтезированного в среде гуминовых

веществ. Показано, что модификация гуминовых веществ гидрохиноном усиливает синергетический эффект действия композиции на патогенные штаммы. В качестве механизма синергетического действия наносеребра, стабилизированного гуминовыми веществами, и линкомицина можно предположить формирование нестойких поверхностных комплексов между гуминовыми веществами и линкомицином, которые могут разрушаться и высвобождать антибиотик при поступлении наночастицы серебра в клетку. Тем самым открывается новый путь борьбы с антибиотикорезистентностью. Синтезированный препарат может рассматриваться как первый кандидат на доклиническое и клиническое тестирование с целью его скорейшего введения в клиническую практику.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;31(4):e00020–18. DOI: 10.1128/cmr.00020-18.
- Dennesen P.J., Bonten M.J., Weinstein R.A. Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Annals of Medicine*. 1998;30(2):176–185. DOI: 10.3109/07853899808999401.
- Reading C., Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1977;11(5):852–857. DOI: 10.1128/aac.11.5.852.
- Li X., Gui R., Li J., Huang R., Shang Y., Zhao Q. et al. Novel multifunctional silver nanocomposite serves as a resistance-reversal agent to synergistically combat carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021;13(26):30434–30457. DOI: 10.1021/acsami.1c10309.
- Panáček A., Kvítek L., Směkalová M., Večeřová R., Kolář M., Röderová M. et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*. 2018;13(1):65–71. DOI: 10.1038/s41565-017-0013-y.
- Li P., Li J., Wu C., Wu Q., Li J. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(9):1912. DOI: 10.1088/0957-4484/16/9/082.
- Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(4):587–590. DOI: 10.1093/jac/dkm006.
- Allahverdiyev A.M., Kon K.V., Abamor E.S., Bagirova M., Rafailovich M. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2011;9(11):1035–1052. DOI: 10.1586/eri.11.121.
- Abdul-Jabbar A.M., Hussian N.N., Mohammed H.A., Aljarbou A., Akhtar N., Khan R.A. Combined anti-bacterial actions of lincomycin and freshly prepared silver nanoparticles: overcoming the resistance to antibiotics and enhancement of the bioactivity. *Antibiotics*. 2022;11(12):1791. DOI: 10.3390/antibiotics11121791.
- Lopez-Carrizales M., Velasco K.I., Castillo C., Flores A., Magaña M., Martinez-Castanon G.A. et al. *In vitro* synergism of silver nanoparticles with antibiotics as an alternative treatment in multiresistant uropathogens. *Antibiotics*. 2018;7(2):50. DOI: 10.3390/antibiotics7020050.
- Masimen M.A.A., Harun N.A., Maulidiani M., Ismail W.I.W. Overcoming methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) using antimicrobial peptides-silver nanoparticles. *Antibiotics*. 2022;11(7):951. DOI: 10.3390/antibiotics11070951.
- Ribeiro A.I., Dias A.M., Zille A. Synergistic effects between metal nanoparticles and commercial antimicrobial agents: A review. *ACS Applied Nano Materials*. 2022;5(3):3030–3064. DOI: 10.1021/acsnm.1c03891.
- Slavin Y.N., Asnis J., Háfeli U.O., Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017;15(1):65. DOI: 10.1186/s12951-017-0308-z.
- Deng H., McShan D., Zhang Y., Sinha S.S., Arslan Z., Ray P.C. et al. Mechanistic study of the synergistic antibacterial activity of combined silver nanoparticles and common antibiotics. *Environmental Science & Technology*. 2016;50(16):8840–8848. DOI: 10.1021/acs.est.6b00998.
- Hwang I.S., Hwang J.H., Choi H., Kim K.J., Lee D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61(12):1719–1726. DOI: 10.1099/jmm.0.047100-0.
- Jamaran S., Zarif B.R. Synergistic effect of silver nanoparticles with neomycin or gentamicin antibiotics on mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. *Open Journal of Ecology*. 2016;6(7):452–459. DOI: 10.4236/oje.2016.67043.
- Verrillo M., Salzano M., Savy D., Di Meo V., Valentini M., Cozzolino V., Piccolo A. Antibacterial and antioxidant properties of humic substances from composted agricultural biomasses. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2022;9(1):28. DOI: 10.1186/s40538-022-00291-6.
- Porras J., Bedoya C., Silva-Agredo J., Santamaría A., Fernández J.J., Torres-Palma R.A. Role of humic substances in the degradation pathways and residual antibacterial activity during the photodecomposition of the antibiotic ciprofloxacin in water. *Water Research*. 2016;94:1–9. DOI: 10.1016/j.watres.2016.02.024.
- Savy D., Di Meo V., Verrillo M., Cangemi S., Cozzolino V., Piccolo A. Novel nanomaterials made of humic substances from green composts and chitosan exerting antibacterial activity. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023;11(26):9674–9683. DOI: 10.1021/acssuschemeng.3c01362.
- Litvin V.A., Minaev B.F. Spectroscopy study of silver nanoparticles fabrication using synthetic humic substances and their antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;108:115–122. DOI: 10.1016/j.saa.2013.01.049.
- Sal'nikov D.S., Pogorelova A.S., Makarov S.V., Vashurina I.Y. Silver ion reduction with peat fulvic acids. *Russ. J. Appl. Chem*. 2009;82(4):545–548. DOI: 10.1134/S107042720904003X.
- Aleksandrova G.P., Lesnichaya M.V., Dolmaa G., Klimenkov I.V., Sukhov B.G., Regdel D. et al. Silver-containing nanocomposites with antioxidant activity based on humic

- substances of different origin. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* 2017;66(1):143–149. DOI: 10.1007/s11172-017-1712-0.
23. Alexandrova G.P., Dolmaa G., Enkhbadral U., Grishenko G.L., Tserenpi S., Sukhov B.G. et al. A new humic acid remedy with addition of silver nanoparticles. *Mongolian J. Chem.* 2012;13(39):7–11. DOI: 10.5564/mjc.v13i0.151.
 24. Zykova M.V., Volikov A.B., Buyko E.E., Bratishko K.A., Ivanov V.V., Konstantinov A.I. et al. Enhanced antioxidant activity and reduced cytotoxicity of silver nanoparticles stabilized by different humic materials. *Polymers.* 2023;15(16):3386. DOI: 10.3390/polym15163386.
 25. Kulikova N.A., Solovyova A.A., Perminova I.V. Interaction of antibiotics and humic substances: Environmental consequences and remediation prospects. *Molecules.* 2022;27(22):7754. DOI: 10.3390/molecules27227754.
 26. Harms J.M., Bartels H., Schlunzen F., Yonath A. Antibiotics acting on the translational machinery. *Journal of Cell Science.* 2003;116(8):1391–1393. DOI: 10.1242/jcs.00365.
 27. Spížek J., Řezanka T. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Biochemical Pharmacology.* 2017;133:20–28. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.12.001.
 28. Roberts M.C. Environmental macrolide – lincosamide – streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology.* 2011;2:40. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00040.
 29. Floyd J.L., Smith K.P., Kumar S.H., Floyd J.T., Varela M.F. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2010;54(12):5406–5412. DOI: 10.1128/aac.00580-10.
 30. Spížek J., Řezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2004;64(4):455–464. DOI: 10.1007/s00253-003-1545-7.
 31. Ayala N., Lara H., Ixtapan L., Rodríguez C. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology.* 2009;5(1):2–9. DOI: 10.1007/s12030-009-9029-1.
 32. Saadh M.J. Effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of Levofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2021;25(17):5507–5510. DOI: 10.26355/eurev_202109_26661.
 33. Sharma A.D., Gutheil W.G. Synergistic combinations of FDA-approved drugs with ceftobiprole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum.* 2023;11(1):e03726-22. DOI: 10.1128/spectrum.03726-22.
 34. Swolana D., Wojtyczka R.D. Activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus* spp. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022;23(8):4298. DOI: 10.3390/ijms23084298.
 35. Kaur A., Preet S., Kumar V., Kumar R., Kumar R. Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019;176:62–69. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.12.043.
 36. Vazquez-Muñoz R., Meza-Villezas A., Fournier P.G.J., Soria-Castro E., Juárez-Moreno K., Gallego-Hernández A.L. et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS One.* 2019;14(11):e0224904. DOI: 10.1371/journal.pone.0224904.
 37. Malawong S., Thammawithan S., Sirithongsuk P., Daduang S., Klaynongsruang S., Wong P.T. et al. Silver nanoparticles enhance antimicrobial efficacy of antibiotics and restore that efficacy against the melioidosis pathogen. *Antibiotics.* 2021;10(7):839. DOI: 10.3390/antibiotics10070839.
 38. Roy A.S., Parveen A., Koppalkar A.R., Prasad M.A. Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.* 2010;1(1):37. DOI: 10.4236/jbnt.2010.11005.

Вклад авторов

Зыкова М.В., Белоусов М.В. – окончательное утверждение рукописи для публикации. Чжан Ю. – разработка методики синтеза композиций гуматов натрия с наночастицами серебра, определение характеристик синтезированных композиций. Лысенко И.В., Михалев Д.А. – выполнение экспериментальной части исследования. Арутюнян Д.А. – обработка и анализ полученных данных, подготовка текста статьи. Азаркина Л.А. – подготовка оригинального текста рукописи. Перминова И.В. – руководство проектом, постановка задачи, обсуждение результатов и подготовка текста статьи.

Информация об авторах

Зыкова Мария Владимировна – д-р фармацевт. наук, доцент, зав. кафедрой химии, СибГМУ, г. Томск, zykova.mv@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-1973-8983>

Чжан Юй – аспирант, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, zhangyu13051837552@gmail.com

Лысенко Илья Владимирович – зам. проректора по образовательной деятельности, г. Челябинск, lussenkoilya@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-8387-9780>

Арутюнян Дмитрий Альбертович – студент, кафедра химической энзимологии, химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, dmitrii.arutiunian@chemistry.msu.ru

Азаркина Людмила Анатольевна – канд. фармацевт. наук, доцент кафедры химии, СибГМУ, г. Томск, ludmila_logvinova@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0167-7043>

Михалев Дмитрий Александрович – ассистент, кафедра химии, СибГМУ, г. Томск, diman021999@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-5292-1368>

Белоусов Михаил Валерьевич – д-р фармацевт. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, mvb63@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-2153-7945>

Перминова Ирина Васильевна – д-р хим. наук, профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией природных гуминовых систем, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, iperminova@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-9084-7851>

(✉) **Перминова Ирина Васильевна**, iperminova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.12.2023;
одобрена после рецензирования 22.12.2023;
принята к публикации 26.12.2023