

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

*На правах рукописи*

**СИНЯВСКАЯ АННА МАКСИМОВНА**

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ЛЁГКИХ МЫШЕЙ С БЦЖ-  
ГРАНУЛЕМАТОЗОМ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОМПОЗИЦИЙ  
ИЗОНИАЗИДА**

Специальность 1.5.22 – клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:**

Заслуженный деятель науки РФ, академик  
РАН, профессор,

доктор медицинских наук

**Шкурупий Вячеслав Алексеевич**

НОВОСИБИРСК 2023

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	
1.1. Патогенез туберкулеза и его нозологические формы.....	15
1.2. Способы лечения туберкулёза	
1.2.1. Способы лечения туберкулёза до открытия <i>M. tuberculosis</i> .....	28
1.2.2. Способы лечения туберкулёза после открытия микобактерии туберкулёза.....	28
1.2.3. Способы лечения туберкулёза после изобретение антибиотиков с противотуберкулёзной активностью.....	29
1.2.4. Проблемы лечения туберкулёза, вызванного штаммами <i>M. tuberculosis</i> с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.....	33
1.3. Частота и патогенез неблагоприятных побочных эффектов противотуберкулезных препаратов.....	35
1.4. Особенности БЦЖ-гранулематоза у мышей как модели туберкулеза у человека.....	42
1.5. Окисленный декстран и его модификации в разработке новых композиций изониазида для лечения туберкулёза.....	42
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
2.1. Лабораторные животные как объект исследования .....	46
2.2. Подготовка печени и лёгких к исследованию .....	48
2.3. Методы гистологической окраски печени и лёгких .....	49
2.4 Методы статистической обработки полученных данных.....	55
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	
3.1.Влияние композиций изониазида на морфофункциональные показатели легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом	
3.1.1. Количество <i>Mycobacterium bovis</i> в лёгких мышей после введения различных композиций изониазида.....	56
3.1.2. Характеристика морфологических изменений паренхимы легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.....	59

3.1.3. Состояние соединительной ткани паренхимы легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида .....	64
3.1.4. Характеристика процессов воспаления в паренхиме легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида .....	72
3.2. Влияние композиций изониазида на морфофункциональные показатели печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом	
3.2.1. Количество <i>Mycobacterium bovis</i> в печени мышей после введения различных композиций изониазида .....	75
3.2.2. Характеристика морфологических изменений паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида .....	79
3.2.3. Состояние соединительной ткани паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида .....	86
3.2.4. Характеристика процессов воспаления паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида .....	94
<b>4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	
4.1. Изменения в печени и лёгких при спонтанном течении БЦЖ- гранулематоза.....	98
4.2. Изменения в печени и лёгких при БЦЖ-гранулематозе у мышей после введения изониазида, побочные эффекты. ....	103
4.3. Морфофункциональные изменения в печени и лёгких мышей с БЦЖ- гранулематозом после введения Декстразида .....	105
4.4. Морфофункциональные изменения в печени и лёгких мышей с БЦЖ- гранулематозом после введения липосомальной формы декстразида; сравнение разных способов введения.....	107

4.5. Липосомальная форма декстразида как способ преодолеть побочные эффекты противотуберкулёзной терапии.....	112
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>117</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>119</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>121</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>152</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Туберкулёз является одним из самых распространённых и опасных инфекционных заболеваний, которое входит в 10 ведущих причин смерти в мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2020 год, в мире ежегодно заболевают туберкулёзом до 10 миллионов человек, из них около 1,5 миллионов человек умирают (Global tuberculosis report 2021. WHO). В России, начиная с 2000 года, уровень заболеваемости туберкулёзом стабильно падает (с 90,4 случаев на 100 000 населения в 2000 году до 41,1 в 2019 году), однако этот показатель остается на достаточно высоком уровне. Уровень смертности от туберкулёза также остается высоким (Сюнякова Д.А., 2021).

В настоящее время основным способом лечения туберкулёза является антибиотикотерапия (Фтизиатрия, под ред. П. К. Яблонского, 2018, Захарочкина Е.Р., 2013). Такая терапия достаточно эффективна, но из-за особенностей туберкулёзного воспаления и персистирования микобактериальной инфекции в гранулёмах она имеет ряд ограничений и побочных эффектов. Гранулёмы — это специфичные скопления макрофагов с очагом казеозного некроза в центре (Paige C., 2010, Pagán A.J., 2015). Роль гранулём в течении болезни неоднозначна. С одной стороны, макрофаги таким образом эффективно изолируют возбудителя, с другой — в отсутствие микроциркуляции ограничены возможности доставки лекарства к микобактерии в гранулёме (Grobler A., 2016; Montes-Worboys A., 2010). Противотуберкулёзные средства ограничено проникают в места наибольшего скопления микобактерий — внутрь гранулём (Kjellsson M.C., 2012). Показано, что большинство противотуберкулёзных препаратов также плохо проникают и в очаги некроза (Lopez-Varela E. et al., 2022). Кроме того, что в крупных гранулёмах не достигается эффективная концентрация лекарств, а субтерапевтические дозы могут способствовать развитию лекарственной устойчивости микобактерий (Dheda K. et al., 2018).

Из-за нежелательных эффектов лекарств и длительности лечения значительная часть пациентов не заканчивают курс терапии или принимают

лекарства нерегулярно, что приводит к полной или частичной неэффективности терапии и развитию рецидивов инфекции (Kempker et al. 2015; Pradipta, Ivan Surya et al., 2018). Неполное или нерегулярное лечение также приводит к развитию форм с лекарственной устойчивостью (Dheda et al., 2017; Pasipanodya et al., 2012).

В основе базовой терапии, с которой начинают лечение до получения анализов на чувствительность к антибиотикам, лежит прием гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК). Изониазид - самый эффективный из препаратов ГИНК для лечения активного туберкулёза, он входит в классификацию Международного союза по борьбе с туберкулёзом и, наряду с рифампицином, относится к препаратам первого ряда (то есть наиболее эффективным), применяется в составе комбинированных схем лечения. Пероксидативная активация изониазида микобактериальными ферментами приводит к образованию реактивных частиц, образующих аддукты с НАД(+) и НАДФ(+), которые являются мощными ингибиторами ферментов биосинтеза липидов и нуклеиновых кислот. Также была показана прямая роль некоторых производных от изониазида реактивных соединений, таких как оксид азота, в ингибировании метаболических ферментов микобактерий. Согласованный эффект этих действий - ингибирование синтеза липидов клеточной стенки, истощение пулов нуклеиновых кислот и метаболическая депрессия - определяют исключительную эффективность и селективность этого лекарства (Unissa A.N et al., 2016; Timmins G.S., Deretic V., 2006).

Однако, применение изониазида сопровождается большим количеством побочных эффектов: токсическое поражение нервной системы, гепатотоксичность вплоть до лекарственного гепатита, раздражение ЖКТ, сыпь, лихорадка (Фисенко В., 2006; Lei S., 2021). Отдельные исследования указывают на связь лекарственного поражения печени с развитием фиброза (Biswas A. et al., 2020., Ким Л.Б. и др., 2020). Одной из причин развития побочных эффектов является низкая молекулярная масса изониазида (137,14 дальтон), из-за которой он быстро выводится из организма, поэтому для создания постоянного достаточно высокого уровня концентрации и эффективного лечения требуется его частое применение.

Осложняющим моментом может быть также наличие в популяции лиц, в организме которых изониазид ацетируется быстрее среднего уровня - «быстрых ацетиляторов» (Wang P. Y. et al., 2012; Khan S. et al., 2019), в таком случае в крови может не достигаться оптимальная концентрация лекарства, а у «медленных ацетиляторов», в свою очередь, увеличен риск гепатотоксичности (Stanley L. A., 2008).

Самой частой формой (до 85%) заболевания является лёгочный туберкулёз и для создания бактерицидных концентраций препарата в ткани лёгких необходима его высокая концентрация в крови, что сопряжено с большим количеством побочных эффектов. Адресная доставка препарата непосредственно к очагу воспаления в меньших количествах может снижать выраженность побочных эффектов без ухудшения лечебной эффективности. Так, ингаляционное введение изониазида, достаточно эффективно, но при его ингаляциях через небулайзер в слизистой бронхов обнаруживается значительное утолщение базальной мембраны, дистрофические изменения реснитчатого эпителия, а так же системные проявления (Авдиенко К. А., и др., 2018; Valiulin S.V. et al.; 2022, Laoharajanart N. et al, 2021). Имеющиеся данные указывают на необходимость дальнейшего усовершенствования химиотерапии имеющимися и новыми противотуберкулёзными препаратами, при назначении которых необходимо предусматривать оптимальный вариант их введения с тем, чтобы создать необходимую концентрацию непосредственно в очаге поражения. Так, например, испытания нового комбинированного противотуберкулёзного препарата Хиксозид, представляющего комбинацию Изониазида с Диоксидином, при ингаляционном введении показали повышение противотуберкулёзной активности изониазида более чем в 5 раз (Морозова Т. Н. и др., 2014).

**Степень разработанности темы исследования.** Чтобы пролонгировать действие изониазида и целенаправленно доставлять антибиотик напрямую к микобактериям и в центр гранулёмы с целью снизить дозу лекарственного препарата, была разработана фармацевтическая композиция изониазида с окисленным декстраном – декстразид (Шкурупий В.А., 2002; Шкурупий В.А.,

2016). Окисленный декстран имеет в своей структуре высоко активные карбонильные группы, которые используются для иммобилизации фармакологически активного антимикробного средства. Окисленный декстран сам по себе обладает иммуностимулирующим действием, преимущественно на клеточное звено иммунитета, антифибротическим, гепатопротекторным, потивовоспалительным и интерферон индуцирующим действиями (Шкурупий В.А., 2006). При создании композиции авторы предполагали, что комплекс изониазид-декстран будет захватываться макрофагами и, длительно гидролизуясь, создавать высокие концентрации изониазида внутри клеток. Помимо непосредственно бактерицидного эффекта изониазида было показано, что окисленный декстран может активировать макрофаги и стимулировать фагосомно-лизосомное слияние, преодолевая незавершенный фагоцитоз при туберкулёзе (Шкурупий, В. А., 2007). Показано, что применение декстразида по сравнению с изониазидом сопровождается меньшими дистрофическими и деструктивными изменениями в органах (Жарков А.С., 2013; Жарков А.С., 2016). С этими данными согласуются результаты исследования гетерополисахаридов фукоиданов как носителей для адресной доставки терапевтических агентов, таких как доксорубин, противотуберкулёзные препараты и т.д. (Супрунчук В.Е., Денисова Е.В., 2019). Такие системы обладают низкой токсичностью и биodeградируемы.

Еще более перспективным является создание нанолипосомальных форм контейнерной доставки в клетки-мишени иммобилизованных на окисленном декстрани антимикробных лекарственных препаратов. Такие комбинированные фармакологические конструкции, содержащие иммобилизованные на окисленном декстрани антимикробные лекарственные препараты, которые размещены как внутри, так и вне нанолипосомальных контейнеров, могут оказывать комбинированное антимикробное действие за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза (Шкурупий В.А., 2019). В этой связи следующим этапом разработки противотуберкулёзных препаратов стало помещение декстразида внутрь липосом (Шкурупий В.А., 2016). Липосомы являются наиболее изученными

«транспортными средствами» за счёт их способности локализоваться в определённых типах клеток (Salem I. I. et al., 2005). Одним из преимуществ препаратов, инкапсулированных в липосомах, является значительное снижение токсичности (Khuller G. K. et al., 2004). Однако противотуберкулёзные эффекты липосомальной формы декстразида изучены недостаточно, особенно на длительных сроках после ее введения. Были проведены только краткосрочные эксперименты с интраперитонеальным введением липосомальной формы декстразида (Шкурупий В.А., 2019). Отсутствуют сведения о ее лечебных эффектах при ингаляционном введении.

Все сказанное послужило основанием для постановки цели и задач диссертационного исследования.

Цель исследования: провести сравнительное изучение на клеточном уровне влияния различных композиций изониазида с окисленным декстраном при их интраперитонеальном и ингаляционном введении на БЦЖ-индуцированное гранулематозное воспаление.

#### Задачи исследования

1. Исследовать влияние различных композиций изониазида с окисленным декстраном на элиминацию микобактерий туберкулёза из паренхимы печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом на длительных сроках введения.
2. Изучить морфологические изменения паренхимы печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном на длительных сроках введения.
3. Охарактеризовать процессы воспаления и деструкции в паренхиме печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном на длительных сроках введения.
4. Изучить реорганизацию соединительной ткани печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении различных композиций изониазида с

окисленным декстраном на длительных сроках введения.

### Научная новизна исследования

1. Впервые показано, что липосомальная форма декстразида при ее интраперитонеальном введении более эффективно, чем изониазид или декстразид, уничтожает персистирующие микобактерии и элиминирует гранулёмы из лёгких и печени мышей с БЦЖ-гранулематозом, оказывает значительно менее выраженные провоспалительные, токсические и профибротические эффекты.

2. Впервые показано, что при ингаляционном введении липосомальная форма декстразида более эффективно уничтожает микобактерии, персистирующие в лёгких, чем при ее интраперитонеальном введении, однако проявляет при этом сходную эффективность в отношении микобактерий в печени; уровни провоспалительных цитокинов и матриксных металлопротеиназ 1 и 9, объём деструктивных изменений в лёгких и печени, а также активность процессов фиброобразования при разных способах введения остаются сходными.

3. Доказано, что ингаляционное введение липосомальной формы декстразида оказывает сравнимые с интраперитонеальным введением системные эффекты, что позволяет впервые говорить о возможности существенно упростить доставку антибиотика в очаг инфекции, расположенный вне лёгких.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обобщённая оценка выраженности элиминации микобактерий, снижения токсичности и профибротического действия, активности процессов воспаления, позволила расположить изониазид и его композиции с окисленным декстраном в порядке нарастания эффективности воздействия на указанные процессы следующим образом: изониазид, декстразид, липосомальная форма декстразида с интраперитонеальным введением, липосомальная форма декстразида с ингаляционным введением.

Полученные результаты доказывают, что на клеточном уровне композиции изониазида с окисленным декстраном обладают более высокой лечебной эффективностью, чем оригинальный препарат изониазид, особенно ее липосомальная форма, что дает основания для проведения доклинических, а в

дальнейшем и клинических исследований этих композиций в качестве противотуберкулёзных препаратов.

Методология и методы исследования: методология исследования базируется на применении принципов и методов комплексного патоморфологического анализа на клеточном уровне, позволяющего установить особенности структурной реорганизации печени и лёгких мышей при БЦЖ-гранулематозе. Используются современные методы комплексного морфологического анализа (световая микроскопия, иммуногистохимические исследования, морфометрический анализ) и адекватные методы статистического анализа. Объект исследований – образцы печени и лёгких мышей после введения вакцины БЦЖ и развития БЦЖ-гранулематоза; предмет исследования – структурная и клеточная реакция печени и лёгких мышей при хронической микобактериальной инфекции без влияния и при введении различных композиций изониазида с окисленным декстраном.

#### Основные положения, выносимые на защиту

1. В цитоплазме макрофагов лёгких и печени через 5 месяцев после заражения БЦЖ обнаружены МБТ; макрофаги объединены в гранулёмы - плотно сгруппированные крупные эпителиоидные клетки с объемной цитоплазмой, заполненной МБТ; гистологическая и цитологическая картина БЦЖ-гранулематоза сходна с такой при туберкулёзе у человека. Через 2 месяца после начала введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном снизились общее количество МБТ в лёгких и печени, объемная и численная плотность гранулём; диаметр гранулём по сравнению с группой без лечения уменьшился после введения липосомальной формы декстразида только в лёгких вне зависимости от способа введения. Через 6 месяцев введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном в паренхиме лёгких всех групп мышей МБТ не обнаружено, в печени – отмечено дальнейшее снижение величин показателей относительно 2-х месяцев введения препаратов.

2. Через 5 месяцев после заражения в цитоплазме макрофагов гранулём и клеток паренхимы лёгких и печени выявлена экспрессия провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$ , а также матриксных металлопротеиназ (ММР) 1 и 9. В лёгких и печени через 2 и 6 месяцев после начала введения изониазида и его композиций с окисленным декстраном наибольшее количество инфильтратов и провоспалительных цитокинов обнаружили у мышей в группе без лечения и в группе, получавшей изониазид; уровни провоспалительных цитокинов и ММР1 и 9 оказались минимальными в группах мышей, получавших липосомальную форму декстразида. Уровень ингибитора матриксной металлопротеиназы 1 (TIMP1) во всех группах обратно коррелировал с уровнем ММР1.
3. Через 5 месяцев после заражения в паренхиме лёгких и печени отмечены деструктивные изменения, вокруг и внутри гранулём наблюдается периферический фиброз в виде коллагеновых и ретикулярных волокон. В лёгких количество коллагеновых волокон в группах мышей, получавших 2 и 6 месяцев изониазид, возрастает относительно группы мышей без лечения и снижается после введения композиций с окисленным декстраном. В печени количество ретикулярных волокон в группах мышей, получавших 2 и 6 месяцев изониазид, возрастает относительно группы мышей без лечения и снижается после введения мышам композиций с окисленным декстраном; количество коллагеновых и ретикулярных волокон минимально в группах мышей, получавших липосомальную форму декстразида вне зависимости от способа введения.

#### Степень достоверности результатов.

Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам и позволяют получить достоверные и доступные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале (всего 105 мышей) с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов исследования и анализа результатов (комплексный морфологический анализ). Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета

статистических программ Statistica 12.0 (StatSoft, США). Для оценки межгрупповых различий использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса для множественного сравнения, при обнаружении статистически значимых различий между группами далее проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как средняя величина показателя и его среднеквадратичное отклонение ( $M \pm SD$ ). Вероятность справедливости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимали при 5% уровне значимости ( $p < 0,05$ ). Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы

#### Апробация результатов исследования.

Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, обсуждены на: VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, Россия, 2018); III Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины» (Новосибирск, Россия, 2018); Девятой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, Россия, 2020); VI съезде российского общества патологоанатомов, (Новосибирск, Россия, 2022); XIV Российской научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Авиценна-2023».

Публикации по теме диссертации. По материалам исследования опубликовано 3 научных статьи и 5 тезисов.

#### Личный вклад соискателя.

Соискателем были лично выполнены:

- забор органов для исследования, их гистологическая обработка и

изготовление парафиновых срезов;

- окраска срезов гематоксилин-эозином, по Ван-Гизон, импрегнация серебром, иммуногистохимические окраски;

- морфометрические измерения и статистический анализ;

- проведен анализ научно-медицинской литературы по изучаемой проблеме и написан литературный обзор;

- написаны все разделы диссертационной работы;

- Автор участвовал в подготовке публикаций по материалам исследования.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Патогенез туберкулёза и его нозологические формы

Род бактерий *Mycobacterium* относится к порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*. Виды микобактерий, вызывающих туберкулёз, объединяют в комплекс *M. tuberculosis*. К нему относятся: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*. В тканях морских животных персистирует *M. marinum*. Заболевания, вызываемые другими микобактериями, называют микобактериозами.

Клетки микобактерий внешне напоминают тонкие, слегка изогнутые палочки, длиной 1-10 мкм, шириной 0,2-0,7 мкм. Аэробы, при окраске по Граму – слабоположительны, спор не образуют, обладают толстой, кислотоустойчивой стенкой. Самый внутренний слой – это плазматическая мембрана, типичная для бактериальных мембран. Внутри плазматической мембраны находится массивное «ядро» клеточной стенки, состоящее из пептидогликанов, ковалентно связанных с гетерополисахаридом арабиногалактаном, который, в свою очередь, этерифицирован на своих концах до  $\alpha$ -алкила. В эту липидную среду включены «свободные» (нековалентно связанные) липиды и липогликаны, которые интересовали исследователей более восьми десятилетий: маннозиды фосфатидилинозитола, димикоцерозаты фтиоцерина, фенольные гликолипиды. Ковалентно связанные миколиновые кислоты ядра клеточной стенки и свободные липиды образуют соответственно внутренний и внешний листки непроницаемого асимметричного бислоя (известного как «микомембрана» или внешняя мембрана), который придает микобактериям характерную устойчивость ко многим терапевтическим препаратам (Jackson M., 2014). Таким образом несмотря на то, что микобактерии являются грамположительными бактериями, они обладают клеточной оболочкой, характеризующейся наличием внешней мембраны и периплазматического пространства. Наружные слои стенки преимущественно состоят из миколовых кислот и их производных и являются важной мишенью в химиотерапии. Производные миколовой кислоты угнетают

активность макрофагов (Sundararajan S., 2021). Еще один важный компонент клеточной стенки микобактерий – липоарабиноманнан. Он пронизывает клеточную стенку микобактерий насквозь, а его маннозные радикалы неспецифически подавляют активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов периферической крови, что приводит к нарушению иммунного ответа на микобактерии. МБТ способны образовывать L-формы, спонтанно и в неблагоприятных условиях (воздействие антибиотиков, ферментов), что приводит к необходимости длительных курсов химиотерапии.

*M. tuberculosis* – крайне устойчивая бактерия. Она сохраняет жизнеспособность во влажном, темном месте до 7 лет. При высыхании, без попадания солнечных лучей она сохраняется до 12 месяцев, в сыром молоке – до 2 недель, в масле и сыре – до 12 месяцев. Самые распространённые хлорсодержащие дезинфицирующие средства убивают эту бактерию только за 5 часов. Таким образом, инфицированность непривитого населения может достигать 70-100% (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016; Васильева И.А., 2017).

Инфекционный процесс начинается с проникновения МБТ в макрофаг. Микобактерии не являются облигатными внутриклеточными паразитами, но большую часть цикла они проводят внутри макрофагов. МБТ может проникать в макрофаги как с помощью неспецифического пиноцитоза, так и через определенные рецепторы (Hmata Z., 2016; Goldberg M.F., 2014). Благодаря структурным особенностям стенки (главным образом липоарабиноманнана) запускаемые сигналы слабо активируют макрофаги, и фагоцитоз не сопровождается выделением активных форм кислорода (Liu C. H., 2017; Korb V.C., 2016). Кроме того, уклонение от иммунного ответа достигается за счет использования липида фтиоцерина димикоцерозерата (PDIM), связанного с клеточной поверхностью для маскировки основных молекулярных паттернов, связанных с патогенами (PAMP). PDIM физически маскируют микобактериальные PAMP и, таким образом, предотвращают их распознавание Толл-подобными рецепторами (TLR) и последующее рекрутирование

микробицидных макрофагов. В отсутствие PDIM PAMPs дают сигнал зависимому от TLR рекрутированию макрофагов, которые продуцируют микробицидные реактивные формы азота. Соответственно, родственные фенольные гликолипиды способствуют привлечению макрофагов через путь, опосредованный хемокиновым рецептором 2 (CCR2) (Cambier C. J. et al., 2014; Arbues A. et al., 2014). Гликолипиды клеточной стенки микобактерий, такие как липоарабиноманн, липоманнан и фосфатидилинозитолманнозид, действуют как агонисты TLR (Saraav I., 2014). Ещё одним защитным механизмом МБТ является то, что, находясь в фагосоме, МБТ запускает механизмы, препятствующие образованию фаголизосомы: выработку сульфолипидов, формирующих отрицательный заряд на поверхности фагосомы, препятствующий её слиянию с лизосомами. Примерно 70% фагосом, содержащих МБТ, не сливаются с лизосомами (van der Wel N., 2007). Блокирование созревания фагосом позволяет МБТ избежать протеолитической деградации и поздних иммунологических реакций, таких как презентация антигена, необходимых для взаимодействия с дендритными и CD4 клетками для инициирования адаптивного иммунного ответа (Hmata Z. et al., 2015). Кроме того, МБТ напрямую угнетают экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), тем самым уменьшая презентацию антигена (Sakai S., 2014). МБТ активно блокирует механизм созревания фагосом путем секреции различных макромолекул, которые мешают этому процессу. Например, две фосфатазы, протеиновая фосфатаза (PtpA) и сывороточная щелочная фосфатаза (SapM), способствуют блокированию созревания фагосом (Vach H., 2008; Vergne I., 2005). PtpA нарушает сборку фагосомного насоса на ранних стадиях инфекции. Насос V-АТФазы – это белковый комплекс, который контролирует закисление фагосом, транспортируя протоны через мембраны. Во время созревания фагосомы лизосомы сливаются с насосом V-АТФазы и доставляют в фагосому протоны. Использование помпы обычно приводит к снижению pH фагосомы с 6,5 до приблизительно 4,5 (Hmata Z., 2016). PDIM, помимо защиты от активации TLR, вносит положительный вклад во внутриклеточный рост МБТ, исключая протон-АТФазу из фагосомной

мембраны (Arbues A. et al., 2014).

Если лизосомы всё-таки сливаются с пораженной фагосомой, МБТ синтезирует аммоний и защелачивает окружающую среду, избавляясь от активных форм кислорода (АФК) и снижая активность лизосомальных ферментов. Защелачивание внутренней среды макрофагов, помимо защиты от прямого разрушения, приводит к нарушению экспрессии белков МНС II на поверхности макрофагов (Sendide K., 2004). Ещё одним способом нейтрализовать закисление фаголизосомы является блокирование НАДФ-оксидазы, активно продуцирующей АФК (Hmama Z., 2016). Новые данные свидетельствуют о том, что патогенность МБТ тесно связана с его способностью регулировать метаболизм клеток-хозяев (Mehrotra P. et al., 2014). Аутофагия обладает как антибактериальным, так и противовоспалительным действием, подавляя рост бактерий и защищая от некроза тканей и патологии лёгких, однако микобактерии обладают способностью управлять её запуском (Dey B. et al., 2015; Puri R. V., 2013).

Апоптоз, важнейший механизм защиты хозяина от патогенов, включает множество компонентов и сложных сигнальных путей. Помимо ограничения роста МБТ на ранней стадии инфекции, апоптоз также играет важную роль в индукции приобретенного клеточного иммунного ответа и при определенных обстоятельствах приводит к гибели клеток (Liu M. et al., 2015). Блокада апоптоза и индукция некроза могут быть одной из основных стратегий, с помощью которых МБТ избегает или задерживает презентацию антигена (Winau F. et al., 2006). МБТ является успешным внутриклеточным патогеном, который развил несколько эффективных механизмов для управления апоптозом хозяина, и многие эффекторы МБТ связаны с путями апоптоза (Danelishvili L. et al., 2014; Hinchey J. et al., 2007; Molle V. et al., 2003; Poirier V., 2014).

Кроме того, у людей, регулярно дышащих воздухом с большим количеством мелких твёрдых частиц (курильщики, шахтеры и т.д.), цитоплазма макрофагов перегружена, и их антибактериальная активность снижена (Berg R.D., 2016). Благодаря обширным метаболическим возможностям микобактерии

способны инактивировать многие вещества, вырабатываемые клетками для защиты от паразитов. Макрофаги являются одними из клеток, накапливающих железо в виде ферритина. Поражая именно их, МБТ получают доступ к большому количеству железа, используя его для своих ферментных систем. Затем, после размножения, происходит прорыв фагосомы в цитоплазму и инактивация антимикробных факторов. Эндотоксины микобактерий – миколовые арабинолипиды, которые угнетают дыхание митохондрий, и фтиеновые и фтионовые кислоты, которые вызывают разобщение окислительного фосфорилирования. Персистируя, МБТ снижают чувствительность макрофагов к активирующим сигналам Т-лимфоцитов (Gold M.C., 2015).

После заселения в макрофаги, МБТ начинают активно делиться и накапливать мутации, даже если не развивается активная стадия болезни. После этого у большинства носителей развивается специфический иммунитет, и инфекция переходит в латентную фазу. Только у 10% зараженных туберкулёзная инфекция возникает в первые два года после заражения, остальные носители могут никогда не заболеть или заболевание возникнет после сильного ослабления иммунитета (Colangeli R., 2020). Накопление мутаций приводит к развитию устойчивости к противотуберкулёзным средствам. На территории России наиболее распространены штаммы под названиями Ural, LAM и Beijing. Самым вирулентным и устойчивым к лекарствам является штамм Beijing, получивший ряд особенностей, повышающих его выживаемость: у него повышен уровень длинноцепочечных жирных кислот, из которых состоит стенка МБТ; понижен уровень белка SseA, защищающий от окислительного повреждения ДНК бактерий, из-за чего мутации накапливаются особенно быстро (Bespyatykh J., 2016).

Основным морфологическим признаком туберкулёзной инфекции в органах является наличие туберкулёзных гранулём, признанных патологоанатомами определяющими изменениями при туберкулёзе более 100 лет назад (Metchnikoff E., 1893; Ramakrishnan L., 2012). Макрофаг играет центральную роль в формировании гранулёмы. После вдыхания МБТ фагоцитируется альвеолярными

макрофагами (Ernst J.D., 2012). Инфицированные альвеолярные макрофаги мигрируют в интерстиций лёгких, выделяя провоспалительные цитокины, такие как IL-1, CCL2, привлекая макрофаги и нейтрофилы (Cohen S.B., 2018). По мере прогрессирования инфекции продолжающееся привлечение и агрегация макрофагов и других иммунных популяций в месте инфицирования МБТ приводит к формированию гранулёмы (Ramakrishnan L., 2012). Макрофаги являются сложной популяцией клеток с высоким уровнем пластичности. После активации макрофаги могут выполнять множество различных, иногда противоречащих друг другу функций, таких как стимулирование воспалительных реакций и ангиогенеза, ингибирование роста опухоли, ремоделирование тканей и разрушение клеток. Исследования показали, что функция макрофагов коррелирует с их микроокружением, особенно с типами и концентрацией цитокинов. Следуя системе классификации Th1/Th2, термины M1 и M2 были введены в номенклатуру макрофагов для определения двух основных поляризованных состояний активации макрофагов (Gordon S., 2010). Обычно поляризация макрофагов M1 (также известная как классическая активация) индуцируется липополисахаридами стенки микобактерии, IFN- $\gamma$ , TLR, передают сигнал через STAT1, что приводит к провоспалительному ответу и увеличению бактерицидной и опухолевой активности, стимуляции Th1-ответа. В микроокружении, где преобладают IL-4, IL-13, IL-6, макрофаги через STAT6 и STAT3, подвергаются поляризации M2 (также известной как альтернативная активация), которая опосредует восстановление тканей, а также ускользание от иммунитета патогенов и опухолей (Li W., 2012; Gordon S., 2010). Комбинация фенотипических и функциональных маркеров подтверждает, что макрофаги с противовоспалительным фенотипом локализованы во внешних областях гранулём, в то время как внутренние области с большей вероятностью содержат макрофаги с провоспалительным, предположительно бактерицидным фенотипом (Mattila J.T., 2013; Marakalala M. J. et al., 2016). На ранних стадиях формирования туберкулёзной гранулёмы большинство макрофагов преимущественно M1-типа (Khan A. et al., 2019). В норме классически активированные макрофаги M1,

которые являются ключевыми эффекторами ответа хозяина на внутриклеточных бактерий и продуцируют иммуностимулирующие цитокины, индуцируются микробными стимулами (например, липополисахаридами (LPS)) или цитокинами (например,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  и ГМ-КСФ) (Ginhoux F. et al., 2017). Уровни экспрессии M1-ассоциированных маркеров постепенно снижаются со временем, в то время как M2-ассоциированные маркеры постепенно увеличиваются, и на поздних стадиях образования туберкулёзной гранулёмы макрофаги в основном типа M2. Переключение макрофагов на M2-фенотип позволяет защитить от чрезмерного воспаления, однако МБТ способна сама влиять на поляризацию макрофагов (Marino S., 2015). Возможно, макрофаги M1 способствуют образованию туберкулёзной гранулёмы, тогда как макрофаги M2 ингибируют этот процесс (Huang Z. et al., 2015). Данные говорят о способности МБТ ингибировать развитие M1 фенотипа макрофагов и репрограммировать макрофаги в сторону M2 фенотипа для лучшей выживаемости (Khan A. et al., 2019). Микобактерии также для лучшей выживаемости способны избирательно рекрутировать альтернативно активированные макрофаги (Cambier C. J. et al., 2014; Mosser D.M., 2003).

Активированные макрофаги во время формирования гранулёмы претерпевают выраженную морфологическую дифференцировку, во время которой они тесно переплетаются и объединяются со своими соседями и трансформируются в эпителиоидные клетки (Pagán A.J., 2018). В дальнейшем, в результате слияния отдельных макрофагов и эпителиоидных клеток образуются гигантские клетки Лангханса. При значительном увеличении диаметра гранулёмы и снижении эффективности диффузии, клетки, находящиеся в центре, начинают погибать от ишемии, в результате чего в центре образуется очаг казеозного некроза (Lenaerts A., 2015). Учитывая разнообразие типов гранулём и характер сборки гранулём по требованию, существует значительная гетерогенность в организации отдельных гранулём (Lin P.L. et al., 2018; Lin P.L. et al., 2014). Типичная зрелая туберкулёзная гранулёма состоит из очага казеозного некроза, окруженного валом из эпителиоидных клеток с примесью лимфоцитов, фибробластов и макрофагов. Среди эпителиоидных клеток лежат гигантские

многоядерные клетки Лангханса – результат слияния нескольких эпителиоидных клеток. При окрасках на соединительную ткань выявляется сеть аргирофильных волокон между клетками гранулёмы и более толстые коллагеновые волокна по периферии. При специфических окрасках на МБТ внутри клеток выявляются МБТ. Диаметр туберкулёзной гранулёмы обычно не превышает несколько миллиметров, но без лечения отдельные мелкие гранулёмы могут сливаться, образуя патологические очаги до десятков сантиметров в диаметре, вплоть до образования огромных, заполненных гноем и казеозными массами каверн. У людей каждая гранулёма функционирует как независимый субъект: в части из них инфекция контролируется и уничтожается, а в других – активно развивается (Lin P. L., 2014). При благоприятном течении заболевания инфекционный агент уничтожается и гранулёмы полностью склерозируются и петрифицируются. Помимо макрофагов, МБТ способны персистировать в мезенхимальных стволовых клетках (МСК), которые встречаются в соединительных тканях. Одна из функций МСК – иммуномодулирующая: подавляя воспаление, они могут способствовать развитию микобактериальной инфекции. Кроме того, МСК способны активно избавляться от попавших внутрь лекарственных препаратов, проникших в клетку, тем самым провоцируя развитие штаммов с лекарственной устойчивостью (Jain N., 2020). Как резервуар для МБТ могут выступать клетки альвеолярного эпителия 1 и 2 типов.

На формирование и поддержание гранулёмы оказывает влияние уровень провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  поддерживает активное воспаление, привлекая в область гранулёмы новые иммунные клетки, активирует Т-клетки и повышает уровень апоптоза. У людей, получающих лечение анти-TNF- $\alpha$  моноклональными антителами, существенно вырастает риск активизации латентной туберкулёзной инфекции (Fallahi-Sichani M. et al., 2010). У мышей, нокаутных по гену TNF- $\alpha$ , серьезно нарушено образование гранулём (Lin P.L. et al., 2007; Chakravarty S.D., 2008). Нейтрализация TNF- $\alpha$  приводит к заметной дезорганизации туберкулёзной гранулёмы (Chakravarty S.D., 2008). Также было продемонстрировано, что центр казеозной гранулёмы накапливает

провоспалительные регуляторы, включая TNF- $\alpha$  и ферменты биосинтеза эйкозаноидов (Marakalala et al., 2016). Хотя TNF- $\alpha$  необходим для индукции активности по уничтожению микобактерий (Clay H., 2008), его чрезмерное производство пагубно для хозяина, увеличивая деструктивные изменения в тканях (Rosa F. J., 2013).

Белки, специфически связанные с МБТ, активируют MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10 и другие MMP, разрушающие внеклеточный матрикс (Tadokera R., 2014; Sundararajan S., 2012; Elkington P. T., Ugarte-Gil C. A., 2011). MMP продуцируются множеством типов клеток, включая воспалительные и иммунные клетки, фибробласты и эпителиальные клетки. Количественное определение циркулирующих MMP в мокроте было предложено в качестве биомаркеров активного туберкулёза, а полиморфизм генов MMP был связан с восприимчивостью к МБТ (Lee S.H., 2009; Hrabec E., 2002). Привлечение неинфицированных макрофагов к гранулёме дополнительно усиливается секрецией MMP-9 эпителиальными клетками, снижение количества MMP-9 ослабляет образование гранулём и размножение бактерий. (Volkman H.E., 2010). Секретируемый бактериями белок ESAT-6 индуцирует MMP-9 в эпителиальных клетках, соседствующих с инфицированными макрофагами. MMP-9 усиливает рекрутирование макрофагов, что способствует увеличению размера гранулёмы. Уменьшение количества MMP-9 уменьшает скорость образования гранулём (Volkman H. E., 2010; Taylor J. L., 2006). Неспецифическое блокирование MMP у мышей на ранней стадии инфицирования снижает гематогенное распространение туберкулёза, возможно, это связано с тем, что деградация внеклеточного матрикса играет роль в облегчении распространения инфекции (Taylor J.L., 2006). Высокий уровень MMP-9 был идентифицирован как биомаркер тяжелого туберкулёзного менингита и связан с повышенной смертностью у людей (Elkington P.T. et al., 2007; Matsuura E., 2000). Концентрация циркулирующего MMP-9 коррелировала с тяжестью заболевания (Hrabec E., 2002). MMP-1 и MMP-9 экспрессируются клетками легочного эпителия, макрофагами, эпителиоидными клетками и даже астроцитами (Price N.M., 2003; Zhu X.W., 2007; Harris J.E., 2007).

До недавнего времени развитие гранулём считалось приспособительным процессом со стороны макроорганизма. Гранулёма рассматривалась как временный орган, возникающий для элиминации инфекционного процесса. Однако, в настоящее время получает новые данные теория о том, что гранулёма может защищать МБТ, изолируя её от окружающих тканей. Персистенция МБТ под защитой гранулёмы может приводить к эволюции устойчивых к лекарствам МБТ и развитию антибиотикорезистентности (Elkington P.T., 2011). Дисбаланс между защитными и деструктивными реакциями тканей хозяина является одной из возможных причин вариабельности клинической картины у пациентов с активным туберкулёзом и высокую частоту латентных инфекций (Kiran D., 2016). Кроме того, гранулёма изолирует МБТ от влияния других иммунных клеток. Внутриклеточно персистирующие МБТ способны рекрутировать новые макрофаги через локус вирулентности ESX-1/RD1. Этот локус позволяет макрофагам быстро находить другие инфицированные макрофаги, что приводит к многократному увеличению числа инфицированных макрофагов (Davis J.M., 2009).

Изоляция МБТ внутри гранулёмы приводит к большим сложностям в доставке лекарств. При неудачном стечении обстоятельств внутри гранулёмы создается микросреда с субтерапевтическим уровнем антибиотика, позволяя МБТ выработать резистентность. МБТ в ходе своей коэволюции адаптировалась в качестве паразита к биологическому хозяину и жизни в гранулёме, таким образом, способность бактерий координировать как рекрутинг, так и гибель макрофагов, предполагает, что бактерии активно пытаются создать среду, идеальную для их распространения и размножения (Martin C.J., 2016) Микобактерии адаптировались к выживанию во враждебной среде, научившись переходить в состояние L-формы, характеризующееся медленным ростом и метаболическим сдвигом, что снижает их восприимчивость к давлению окружающей среды (Wayne L.G., 1996). Более того, бактерии разработали стратегии выживания в гипоксической среде, встречающейся в казеозных гранулёмах, путем индукции сложных транскрипционных сетей, таких как DosR

(Leistikow R. L. et al., 2010). Среда обитания внутри гранулёмы тяжела для микобактерий, но они выработали механизмы приспособления к ней. На гипоксию микобактерия реагирует переходом в L-форму и снижением метаболической активности, что, в свою очередь, снижает эффективность антибиотиков. Кроме того, МБТ могут вызывать усиление ангиогенеза в гранулёме; показано, что ингибирование VEGFR увеличивало количество гранулём (Oehlers S.H. et al., 2015). Чтобы выжить в среде со смертельной концентрацией активных форм кислорода и азотных радикалов, бактерии полагаются на систему DosR (Kumar A. et al., 2007). Также им требуется несколько антиоксидантных ферментов. Супероксиддисмутаза (SodA) играет важную роль, обезвреживая ионы кислорода. МБТ секретирует SodA наружу, в отличие от других видов бактерий, где SodA является цитозольным ферментом (Braunstein M. et al., 2003). Совсем недавно было показано, что SodA является внеклеточным компонентом мембранно-ассоциированного оксидоредуктазного комплекса с DoxX и SseA. Этот макромолекулярный комплекс позволяет клетке реагировать на окислительный стресс не только за счет детоксифицирующих радикалов, но и за счет регулирования цитозольного окислительно-восстановительного гомеостаза через пулы тиолов (Nambi S. et al., 2015). В настоящее время разрабатывается терапия, нацеленная на образование гранулём. Так, ингибиторы TNF- $\alpha$  уменьшают воспаление и размеры гранулём. Метформин индуцирует выработку митохондриальных активных форм кислорода и увеличивает слияние фаголизосом. Ингибиторы металлопротеиназ увеличивают количество доставленных противотуберкулёзных препаратов внутрь гранулёмы. Статины вызывают аутофагию и увеличивают созревание фаголизосом в макрофагах (Guler R. et al., 2021). Центральная роль гранулёмы в формировании иммунных ответов хозяина предполагает, что воздействие на образование гранулём можно использовать в качестве потенциальной дополнительной терапии. Разрушение гранулёмы может способствовать улучшению способности важнейших типов клеток распознавать и уничтожать микобактерии внутри гранулёмы либо непосредственно, либо посредством Т-клеточных реакций.

Потеря целостности гранулёмы может усилить диффузию и распознавание микобактериальных продуктов иммунной системой хозяина, потенциально способствуя более продуктивному ответу иммунной системы хозяина. Точно так же потеря целостности гранулёмы может повысить способность цитокинов хозяина или иммунных молекул, таких как антитела, получать доступ к бактериям и клеткам в центре гранулёмы. Помимо влияния на иммунный ответ хозяина, гранулёма также служит существенным барьером для терапевтической эффективности лечения антибиотиками (Cronan M. R., 2022).

Наибольший стресс, испытываемый микробом, вызван антибактериальной терапией. МБТ известна своей устойчивостью к химиотерапии, поэтому требуются длительные курсы антибиотиков с несколькими лекарственными препаратами. Долгое время считалось, что медленная скорость роста МБТ и их способность входить в нерепликативное «персистирующее» состояние были основными движущими силами необходимости длительной антибактериальной терапии. Однако недавние исследования показывают, что сама гранулёма создает сложный диффузионный барьер, из-за которого доступ в центр гранулёмы различных лекарств отличается (Prideaux V. et al., 2015). Образовавшаяся внутри гранулёмы микросреда позволяет субпопуляциям МБТ подвергаться субтерапевтическим дозам лекарств, давая этим бактериям возможность развить антибиотикорезистентность. Таким образом, поселившись в гранулёме, микобактерии нашли идеальную нишу для защиты от лечения антибиотиками. Жизненный цикл МБТ требует гранулёмы для эффективного распространения, микобактерии сами стимулируют гранулематозный ответ организма. Исследования с использованием нокаутных бактерий помогли раскрыть некоторые пути, участвующие в выживании микобактерий и адаптации к гранулёме (Martin C. J., 2016).

При туберкулёзной инфекции зачастую развиваются фибротические осложнения. Обычно это рассматривается как процесс неполной репарации повреждённого органа. Фиброзирование гранулём обычно связано с их заживлением. Грубая соединительная ткань с одной стороны изолирует

инфицированную ткань от здоровой, но с другой стороны образовавшиеся рубцы существенно снижают функционал ткани, особенно лёгких, нормальное функционирование которых подразумевает постоянное движение. (Warsinske H.C. et al., 2017). Коллаген может ограничивать эластичность лёгких, препятствовать вдоху и вызывать затруднения дыхания.

Один из основных способов деления форм туберкулёза – это деление на открытую и закрытую формы. При открытой форме в естественных выделениях больного можно обнаружить палочки Коха, либо очаг поражения непосредственно сообщается с окружающей средой. Больные закрытой формой патогенных бактерий практически не выделяют (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016).

Органы дыхания, в подавляющем большинстве случаев лёгкие, поражаются *M. tuberculosis* чаще всего. Инфекционный процесс в лёгких может иметь разнообразные морфологические проявления, развивающиеся в зависимости от состояния иммунитета, штамма возбудителя, пути заражения.

Различают первичный и вторичный туберкулёз лёгких. Развитие первичного туберкулёза наблюдается после первичного заражения микобактерией. Особенностью течения первичного туберкулёза является то, что возможно самоизлечение без специального лечения, но без полной элиминации микобактерий, в тканях остаются очаги с сохраняющейся жизнеспособность бактерией. У детей и подростков первичный туберкулёз составляет 10-20% от общего числа случаев, у взрослых – это менее 1%. Вторичный туберкулёз может развиваться после распространения инфекции из первичного очага или в результате повторного заражения, после излечения от первичного туберкулёза, так как иммунитет после излечения от туберкулёза формируется нестойкий (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016; Васильева И.А., 2017).

Практически любой орган может быть поражен МБТ. У человека наблюдают туберкулёз лёгких, костей и суставов, почек и мочевыводящих путей, половых органов, туберкулёз кожи, перикарда, глаз и других органов.

## **1.2. Способы лечения туберкулёза**

### *1.2.1. Способы лечения туберкулёза до открытия *M. tuberculosis*.*

До того момента, когда была открыта инфекционная природа туберкулёза и произошло его выделение в отдельную нозологию, все болезни, сопровождающиеся дыхательной недостаточностью, объединяли. А так как причину видели в чем-то общем, то и лечение было одинаковым для пневмонии, рака лёгкого, туберкулёза и сердечной недостаточности. Лечение, в основном, было основано на предположении о недостаточности воздуха, и поэтому главной рекомендацией были прогулки. Большая часть заболеваний истощает тело, поэтому также предписывалось хорошее питание (Сорокина Т.С., 2009; Склярова Е.К., 2015). Причину кровохарканья видели в образовании в лёгких нарыва, который нужно было каким-либо образом вскрыть и дренировать. Для этого между ребер формировали язву, которая должна была нагноиться и «вытянуть» гной из лёгких. Менее радикальным способом было попробовать громко кричать, смеяться, нюхать уксус и перец и чихать, быстро ездить в телеге по разбитой дороге для вскрытия внутреннего нарыва от механического воздействия (Матвеевский М.А., 1849; Кашинский И., 1862).

### *1.2.2. Способы лечения туберкулёза после открытия микобактерии туберкулёза.*

24 марта 1882 года произошла революция в изучении туберкулёза. Роберт Кох на заседании общества врачей в Берлине представил результаты своего многолетнего исследования. Только в работе Р. Коха были предъявлены неоспоримые доказательства существования возбудителя туберкулёза, убедившие врачебный мир. В настоящее время 24 марта объявлено ВОЗ Всемирным днем борьбы с туберкулёзом (Сорокина Т.С., 2009). Доказательство инфекционной природы туберкулёза изменило отношение к образу жизни больных, но практически не повлияло на способы лечения. Больные изолировались в высокогорных санаториях, иногда применялся искусственный пневмоторакс и

пневмоперитонеум для исключения больного легкого из процесса дыхания. Но случаи излечения были крайне редки, и диагноз становился приговором.

После открытия микобактерии Кохом был предложен метод лечения туберкулёза туберкулином – фильтратом культуральной жидкости *M. tuberculosis*, в которой отсутствуют сами бактерии, но содержатся отдельные её части. Однако, практически сразу препарат показал свою очень высокую токсичность при отсутствии положительного эффекта. Несмотря на это Кох продолжал настаивать на эффективности туберкулина, и только вмешательство другого авторитета, «короля» патологической анатомии Рудольфа Вирхова, привело к отмене использования туберкулина для лечения туберкулёза. Но в ходе использования туберкулина была отмечена разница в подкожной реакции между здоровыми и зараженными туберкулёзом людьми. Так была изобретена туберкулиновая проба, или по фамилии врача, её доработавшую, реакция Манту (Сорокина Т.С., 2009).

*1.2.3. Способы лечения туберкулёза после изобретение антибиотиков с противотуберкулёзной активностью.*

19 октября 1943 года Зельманом Ваксманом из почвенных грибов актиномицетов был выделен стрептомицин – первый противотуберкулёзный антибиотик, ставший первым по-настоящему эффективным лекарством. Стрептомицин до сих пор используется в комбинации с другими препаратами. Однако у данного препарата было достаточно много серьёзных побочных эффектов. После лечения часть людей теряла слух, у других появлялись серьёзные проблемы с почками и кишечником. Кроме того, довольно быстро, в течение нескольких лет начали появляться штаммы, резистентные к стрептомицину. В 1944 химиком Карлом-Густавом Росдалем и врачом Йёргеном Леманном была синтезирована и доказана эффективность пять-амино-салициловой кислоты (ПАСК). Благодаря ПАСК резистентность удалось преодолеть. С 1952 года началось широкое применение основного на сегодняшний день противотуберкулёзного препарата – изониазида,

синтезированного русским химиком А.Т. Качугиным. На сегодняшний день основным методом лечения туберкулёза является полихимиотерапия. За последние 70 лет появилось большое количество препаратов с противотуберкулёзной активностью (Мишин В.Ю., 2015; Сорокина Т.С., 2009; Склярова Е.К., 2015).

В середине прошлого века появились практически все современные противотуберкулёзные препараты: циклосерин, этионамид, канамицин, капреомицин, рифампицин, этамбутол. Позднее в 80-е годы были синтезированы антибиотики группы фторхинолонов, некоторые из которых активны в отношении микобактерии туберкулёза. Фторхинолоны останавливают синтез ДНК в клетках МБТ за счёт ингибирования ДНК-гиразы, «распутывающей» узлы, возникшие в ходе репликации. Блокирование её работы приводит к множественным разрывам цепи и остановке синтеза ДНК. Однако гиразы микобактерий гораздо более устойчивы к действию фторхинолонов, чем гиразы большинства бактерий. Введение каждого нового антибиотика в активное применение приводило к развитию устойчивости. Был принят как стандарт режим полихимиотерапии (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2015; Сорокина Т.С., 2009).

### **Классификация противотуберкулёзных препаратов**

Препараты первого ряда: изониазид, рифампицин, этамбутол, пипразинамид, стрептомицин, их применяют для лечения впервые выявленного туберкулёза.

Препараты второго ряда (резервные препараты): протионамид, этионамид, рифабутин, аминосалициловая кислота, циклосерин, фторхинолоны: офлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин, канамицин, капреомицин. Эти лекарства используют для лечения туберкулёза, вызванного устойчивым к препаратам первого ряда возбудителем либо непереносимости основных средств. При коррекции схемы лечения никогда не добавляют единственный препарат резерва, это может послужить причиной формирования лекарственной устойчивости (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016).

В настоящее время из-за распространения штаммов микобактерии с множественной лекарственной устойчивостью обе группы являются основными. Как препараты резерва используются антибиотики с ещё недостаточно доказанным эффектом в отношении микобактерии: кларитромицин, амоксиклав, клоfazимин, линезолид.

По способу воздействия на микобактерию выделяют бактерицидные и бактериостатические препараты. Бактерицидные препараты воздействуют и уничтожают микобактерию, бактериостатические – останавливают метаболизм и размножение микроорганизма. К бактерицидным препаратам относятся такие лекарства как изониазид (в отношении активных микобактерий), стрептомицин, пипразинамид, фторхинолоны. Бактериостатические лекарства: изониазид (на микобактерии в стадии покоя), рифампицин, этамбутол, пипразинамид.

Микобактерии находятся в организме в двух формах: активно размножающейся и персистирующей. В связи с этим принято деление курса химиотерапии на две фазы. Во время начальной, интенсивной фазы идёт подавление размножения и активного метаболизма микобактерий. Чем эффективнее будет проведена данная стадия, тем меньше вероятность развития лекарственной устойчивости. В интенсивной фазе применяют основные противотуберкулёзные препараты: изониазид, рифампицин, пипразинамид, этамбутол и стрептомицин. В условиях доказанной лекарственной устойчивости к основным препаратам для лечения используют препараты резерва. Длительность интенсивной фазы занимает до шести месяцев.

Цель второй фазы лечения – уничтожение «спящих» форм бактерий. Особенности жизненного цикла бактерий таковы, что микроорганизм может длительное время находиться внутри клетки, практически не проявляя метаболической активности. Необходимо предупреждать активное размножение микобактерий, а также пытаться стимулировать восстановительные процессы в лёгких. Этот этап проводится в течение длительного времени, до 12 месяцев, так как чрезвычайно сложно воздействовать на «спящие» формы микобактерии.

Необходимым условием эффективного лечения является непрерывный

приём препаратов на протяжении всего срока лечения.

Эффективность лечения также зависит от схемы приёма лекарств. Наилучшая эффективность против бактерий достигается при приеме всей суточной дозы противотуберкулёзных препаратов за раз. При появлении тяжёлых побочных эффектов допускается её разделение на 2 дозы, но с минимальным временным интервалом между ними. Часть противотуберкулёзных препаратов допустимо применять прерывисто (Mirzayev F. et al., 2020). Изониазид, канамицин, амикацин, этамбутол достаточно эффективны при применении три раза в неделю. Однако интермиттирующее введение требует более высокой дозы, чем ежедневное (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016).

Сочетание оптимального набора противотуберкулёзных препаратов, их доз, способа и режима введения должно определяться и при необходимости корректироваться с учетом:

- статистических данных о лекарственной устойчивости микобактерии в данном регионе;
- распространённости, тяжести процесса и характера заболевания;
- динамики физиологических показателей больного, динамики бактериовыделения.

Процесс определения лекарственной чувствительности микобактерии занимает 2,5-3 месяца. Поэтому начинают курс химиотерапии со стандартного набора самых эффективных препаратов, корректируя его после получения данных о чувствительности. Разработано несколько режимов антибиотикотерапии (Борисов С.Е., 2001).

Для выбора оптимального режима следует учесть:

- показания и противопоказания для назначения конкретных препаратов;
- форму, распространённость инфекционного процесса;
- возможность контроля за приемом больным лекарств;
- какими методами и как часто будет обследован больной.

#### *1.2.4. Проблемы лечения туберкулёза, вызванного штаммами *M. tuberculosis* с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.*

Развитие лекарственной устойчивости микроорганизмов связано с селекцией в присутствии антибиотика и с преимущественным выживанием части микробной популяции, имеющей механизмы защиты против антибактериального агента (Seung K.J., 2015; Murray C.J.L. et al., 2022). Одной из основных проблем, связанных с текущими протоколами лечения ТБ, является длительная продолжительность терапии, которая вызывает плохое соблюдение пациентом режима лечения, что приводит к увеличению случаев лекарственно-устойчивого туберкулёза и высокой смертности среди пациентов, не поддающихся лечению (Lange C. et al., 2018).

Выделяют первичную и приобретенную лекарственную устойчивость. Под первичной лекарственной устойчивостью понимают наличие резистентности у штаммов, выделенных у пациента, не получавшего антибиотикотерапию, или получавшего препараты менее месяца. В структуре антибиотикорезистентности различают моно- и полирезистентность: устойчивость соответственно к одному или нескольким препаратам. Монорезистентность чаще всего регистрируется к стрептомицину и изониазиду. Под термином множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) подразумевают резистентность микобактерии одновременно к рифампицину и изониазиду, что обычно сопровождается устойчивостью к стрептомицину. В настоящее время Россия, Индия и Китай являются тремя странами-лидерами по числу больных туберкулёзом с множественной лекарственной устойчивостью микобактерии туберкулёза (МЛУ МБТ). На долю этих стран приходится 45% бремени туберкулёза с МЛУ МБТ. При этом более половины штаммов МБТ с МЛУ устойчивы не только к изониазиду и рифампицину, но и к остальным препаратам основного ряда и 2-3 препаратам резервного ряда. Ситуация значительно осложняется появлением наиболее опасной разновидности туберкулёза с МЛУ МБТ, фактически возвращающей нас в «доантибактериальный период» – туберкулёза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ МБТ), при которой к устойчивости к изониазиду и

рифампицину присоединяется устойчивость МБТ к фторхинолонам и к одному из аминогликозидов или полипептиду (Иванова Д. А., 2013; Seung K. J., 2015). В 2009 году появление туберкулёза, вызванного ШЛУ МТБ, отмечено в 60 странах мира, в том числе и в России (Самойлова А.Г., 2017). В 2019 году в России уровень заболеваемости МЛУ туберкулёзом составил около половины всех случаев заболеваемости (21,4 случая на 100 000 населения). В настоящий момент ведутся множество работ по преодолению лекарственной устойчивости (Lange C. et al., 2019; Winston C. A., 2012; Tweed C. D. et al., 2019; Walzl G. et al., 2018).

Во всём мире в 2019 году около 500 000 человек заболели туберкулёзом с устойчивостью к рифампицину, из которых 78% имели множественную лекарственную устойчивость. 3,3% от всех новых случаев заболеваемости и 17,7% повторных случаев были МЛУ туберкулёзом (Сайт ВОЗ, 2020). В некоторых странах на штаммы с МЛУ приходится до 20% новых случаев ТБ и более 50% пациентов, которые ранее лечились от туберкулёза (Skrahina A. et al., 2012; Seaworth B. J., 2017). В странах, где лечение туберкулёза было начато сразу с введения полихимиотерапии, (Чили, Кения, Куба, Уругвай), устойчивость к лекарственным препаратам развивалась минимально. В тех странах, где антибиотики начинали бесконтрольно применять сразу после их появления на рынке, в данный момент наблюдается распространение лекарственно устойчивых штаммов и существенно ухудшается прогноз (Conradie F. et al., 2020). Так, китайские центры по контролю и профилактике заболеваний сообщили, что 10% из 1,4 миллиона больных туберкулёзом в Китае больны МЛУ-ТБ (Zhao Y. et al., 2012). МЛУ-ТБ также является растущей проблемой в Южной Африке, где высокий уровень заболеваемости ВИЧ (вирусом иммунодефицита человека) усугубил как распространение, так и смертоносность МЛУ-ТБ, порождая призрак «идеального шторма» коинфекции МЛУ-ТБ/ВИЧ (Wells C. D. et al., 2007).

### **1.3. Частота и патогенез неблагоприятных побочных эффектов противотуберкулёзных препаратов.**

Лекарственные средства, используемые для лечения туберкулёза, имеют множество тяжелых побочных эффектов (Кононенко В.Г., Шкурупий В.А.). Большинство противотуберкулёзных препаратов жирорастворимы, и для их устранения требуется биотрансформация в более водорастворимые соединения. Это в основном осуществляется печеночными ферментами биотрансформации фазы I и фазы II. В реакции фазы I происходит окисление или деметилирование, обычно осуществляемое ферментами цитохрома P450 (CYP450). Соединение обычно еще не растворимо в воде и требует дальнейшего метаболизма. Реакции фазы I часто приводят к образованию токсичных промежуточных продуктов. В типичной реакции фазы II большое водорастворимое соединение присоединяется путем глюкуронирования или сульфатирования, в результате чего образуются нетоксичные метаболиты, которые можно легко удалить. Третий метаболический этап детоксикации включает глутатион, который может ковалентно связываться с токсичными соединениями с помощью фермента глутатион-S-трансферазы (Lee W.M., 1995).

Лекарственные препараты из группы изониазида являются химическими конкурентами пиридоксина и, выступая в качестве кофермента, вместо пиридоксина ингибируют активность многих белков. Нарушается нервная проводимость, возникают бессонница, судороги, нарушается гемопоэз. У больных эпилепсией учащаются судороги. Кроме опосредованного действия, связанного с недостатком витамина B6, ГИНК обладает собственной токсичностью. В ходе его метаболизма в печени образуется высокотоксичное вещество – метилгидразин, повреждающее клетки. Кроме того, ГИНК влияет на сердечную мышцу, увеличиваются дистрофические изменения миокарда, появляется тахикардия. Снижая устойчивость капилляров, изониазид может вызывать кровохарканье. Передозировка ГИНК может привести к летальному исходу. Наиболее частыми побочными эффектами противотуберкулёзного лечения являются гепатотоксичность, кожные реакции, желудочно-кишечные и неврологические

расстройства. Гистологические характеристики тяжелого повреждения печени, вызванного ГИНК, включают гепатоцеллюлярное повреждение с мультилобулярным некрозом и инфильтрацией мононуклеарными клетками, которое морфологически и клинически неотличимо от вирусного гепатита. Гепатотоксичность, вызванная противотуберкулёзными препаратами, снижает эффективность лечения. Бессимптомное повышение уровня трансаминаз является обычным явлением во время противотуберкулёзного лечения, но гепатотоксичность может быть фатальной, если ее не распознать на ранней стадии и вовремя не прервать терапию. Побочные эффекты снижают эффективность лечения, поскольку они в значительной степени способствуют несоблюдению режима лечения, что в конечном итоге приводит к неэффективности лечения, рецидивам или возникновению лекарственной устойчивости (Каона F.A., 2004). Тяжелая печеночная недостаточность во время стандартного лечения развивается с вероятностью 2-28%, в зависимости от популяции и фазы лечения (Tostmann A. et al., 2008). Скорость ацетилирования белков у человека определяется генетически, людей можно разделить на медленных и быстрых «ацетиляторов» (Parkin D.P., 1997). Хотя существует ограниченная информация о концентрациях изониазида, вызывающих токсические реакции, можно предложить скорректировать дозировку изониазида в зависимости от статуса ацетилирования: более низкая доза для медленных ацетиляторов для снижения риска лекарственного гепатита и более высокая дозировка изониазида для быстрых ацетиляторов для повышения бактерицидной активности, и тем самым снизить вероятность неудачи лечения (Wen X., Wang J.S., 2002).

Рифампицин является мощным индуктором системы CYP450 в печени и в кишечнике, тем самым увеличивая метаболизм многих других соединений. Комбинированное применение рифампицина и изониазида было связано с повышенным риском гепатотоксичности (Kolars J.C., 1992). Рифампицин также взаимодействует с антиретровирусными препаратами и влияет на уровни этих препаратов в плазме, а также на риск гепатотоксичности (Kwara A., 2005). Показано, что одновременный длительный приём рифампицина и изониазида

приводит к развитию в печени окислительного стресса, активируя цитохром P450 и повышая активность НАДФН-оксидазы, что приводит к развитию фиброза печени (Biswas A. et al., 2020.).

Этионамид, циклосерин также оказывают неблагоприятное воздействие на нервную систему, что проявляется депрессией, психозами, бессонницей. Стрептомицин и канамицин имеют выраженный ото- и нефротоксический эффект. Приём ГИНК, этионамида может вызвать гормональные нарушения: гинекомастию у мужчин, нарушения менструального цикла у женщин. Печень, являясь основным органом дезинтоксикации, подвергается наибольшему вреду, вплоть до развития лекарственного гепатита на фоне приёма изониазида и рифампицина (Баласанянц Г.С., 2011).

Для снижения гепатотоксичности препаратов применяют гепатопротекторы на фоне постоянного мониторинга показателей печени. В целях снижения нейротоксичности используют витамины группы В, глутаминовую кислоту, АТФ (Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации, 2016; Баласанянц Г. С., 2011). Значительная часть препаратов (стрептомицин, изониазид), при появлении некоторых тяжелых побочных эффектов требуют отмены препарата (Иванова Д. А., 2014; Мишин В.Ю., 2006). Следует учитывать, что туберкулёз особенно распространён среди пожилых людей, лиц с иммунодефицитом, алкоголизмом, что повышает риск развития побочных эффектов на фоне сопутствующей патологии.

Для стерилизации туберкулёзных очагов необходима адекватная экспозиция противотуберкулёзных препаратов в очаге заболевания. Дозировка лекарственных препаратов для детей в соответствии с текущими рекомендациями по лечению основана на массе (Radtke K.K. et al., 2019). Но у детей наблюдаются более низкие концентрации большинства противотуберкулёзных лекарств в плазме при той же дозе в миллиграммах на килограмм по сравнению со взрослыми. (Lopez-Varela E. et al., 2022). В настоящее время необходима разработка более щадящего препарата для лечения детей, с учётом особенностей детского организма.

Кроме упомянутых выше средств и способов лечения туберкулёза,

операционное лечение используют в виде средства выбора в том случае, когда терапевтические лекарственные методы лечения не могут быть альтернативой хирургии. Операционное лечение в основном используют для полной элиминации инфекционного резервуара (Отс О.Н., 2009; Madansein R., 2015) в случае недостаточной или полной неэффективности химиотерапии (Seung K. J., 2014).

### **Способы введения противотуберкулёзных средств. Преимущества ингаляционной формы введения.**

Легочный туберкулёз является самой частой формой данной инфекции. Около 85% составляют случаи легочного туберкулёза (Global tuberculosis report, 2020). Традиционная терапия инфекций дыхательных путей заключается во введении противомикробных препаратов перорально или парентерально. Пероральный путь, как правило, является наиболее удобным и, как правило, самым безопасным и наименее дорогим. Однако ограничения перорального введения включают более медленное начало действия и снижение лечебного эффекта после первого прохождения через печень. Кроме того, некоторые лекарства при приеме внутрь плохо всасываются из-за химической полярности или нарушения всасывания (Turner et al., 2011). При парентеральном пути введения лекарства имеют самую высокую биодоступность и не подвергаются метаболизму при первом прохождении через печень или неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта. Кроме того, такое введение обеспечивает идеальный контроль над фактической дозой препарата, доставляемого в организм (Clark M. A. et al. 2012). Однако парентеральное введение часто достаточно болезненное, при нём может быть затруднено надлежащее соблюдение режима лечения и требуется постоянное присутствие медицинских работников (Blumberg et al., 2003, Prabakaran et al., 2004). Важно отметить, что оба этих традиционных пути введения могут привести к субтерапевтическим уровням противотуберкулёзных препаратов в очаге инфекции из-за плохого распределения большинства системно вводимых препаратов в лёгких. В результате могут быстро появиться лекарственно-устойчивые штаммы (Conte et al., 2002). Несмотря на то, что в зонах инфекции обычно достигаются терапевтические концентрации

лекарств, вводимые противотуберкулёзные препараты могут не проникать в гранулёмы, внутри которых персистируют микобактерии. Помимо ограничения путей введения, пролонгация лечения является серьезной проблемой. Для противотуберкулёзных препаратов, имеющих узкое терапевтическое окно и требующих длительного режима лечения, может быть снижена приверженность пациентов лечению, что повышает вероятность появления лекарственно-устойчивых штаммов. Увеличение продолжительности лечения также ограничивает дозировку лекарств из-за развития побочных реакций (Sacks et al., 2001). Разработка составов противотуберкулёзных препаратов, доставляемых непосредственно в лёгкие, является перспективным направлением исследований. Ранее была исследована прямая доставка противотуберкулёзных препаратов путем распыления растворов лекарств. Так же изучались различные препараты для доставки лекарств в лёгкие в виде частиц, содержащих противотуберкулёзные агенты: микрочастицы (Hirota et al., 2010; Muttill et al., 2007), наночастицы (Pandey et al., 2003), липосомы (Chimote and Banerjee, 2010), лекарственные порошки, связанные с ингаляционными вспомогательными веществами (García-Contreras L. et al., 2007). Количество препарата, достигающего очага инфекции, может быть небольшим из-за плохого распределения большинства системно вводимых препаратов в лёгких. Доставка лекарств путем ингаляции непосредственно в лёгкие приводит к тому, что локальная концентрация лекарства намного выше, чем достижимая при пероральном или парентеральном введении (Wood G. C. et al., 2007). Лекарство, имеющее узкое терапевтическое окно или требующее продолжительного режима лечения обычными путями введения, при введении ингаляционным путем будет иметь сниженное системное воздействие и токсичность. Следовательно, этот подход может быть выгоден, когда система пациента перегружена традиционным набором химиотерапевтических агентов, используемых для лечения туберкулёза. Ингаляционная доставка лекарств применяется для лечения различных местных инфекционных заболеваний, но для лечения туберкулёза в настоящее время такой препарат отсутствует. Ингаляционная терапия туберкулёза может быть

эффективна для доставки лекарств к макрофагам, зараженным МБТ. Лекарственные средства на основе липосом, микрочастиц, и твердых липидных наночастиц могут захватываться макрофагами и доставлять препараты напрямую к бактериям (Muttill P. et al., 2009; Pandey R. et al., 2005).

Ранее использовали раствор аминогликозидов (стрептомицин, канамицин, амикацин), вводимый через небулайзер для пациентов с туберкулёзом лёгких с положительным мазком. В результате аминогликозиды ингибировали рост бактерий в альвеолах и предотвращали передачу (Sacks L.V. et al., 2001; Koh W.J. et al. 2004). Но, похоже, что простого распыления противотуберкулёзного препарата недостаточно. Для эффективного уничтожения бактерий лекарственные препараты должны быть включены в подходящие системы доставки, обеспечивающие их быстрое поглощение макрофагами, в которых находятся бактерии туберкулёза. Чтобы воспользоваться преимуществами доставки в лёгкие, а также преодолеть некоторые проблемы, возникающие при лечении туберкулёза, были разработаны противотуберкулёзные препараты с системами доставки в виде частиц для введения в лёгкие. К носителям лекарств в виде частиц относятся липосомы, наночастицы, микрочастицы (Justo O.R. et al., 2003; Zhou H. et al., 2005; Pandey R., 2005). Эти ингаляционные противотуберкулёзные препараты в виде частиц могут использоваться для ингаляционной терапии. Они показали более низкие дозы лекарств, более низкую токсичность, а также более низкую частоту дозирования, что было полезно для пациентов с легочным туберкулёзом при длительном лечении.

Липосомы представляют собой сложные везикулы, состоящие из фосфолипидов, которые могут инкапсулировать различные типы лекарств. Липосомы имеют большое разнообразие структур, но все они состоят из одного или нескольких липидных бислоев, окружающих водное пространство. Липосомы могут быть изготовлены с использованием различных липидов, которые могут быть нейтральными, катионными или анионными и поступать из природных или синтетических источников (Cipolla D., 2013). Наиболее часто используемыми липидами являются лецитины: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин,

фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин и сфингомиелин (Cipolla D., 2013). Свойства липосом определяются липидным составом, размером, поверхностным зарядом, ламеллярностью и методом приготовления (Schreier, Hans, 1993). Будучи сконструированными из мембраноподобных компонентов клеток млекопитающих, липосомальные составы являются биосовместимыми и биоразлагаемыми и могут проникать в биопленки и внутриклеточные пространства, включая макрофаги (Elhissi A., 2017; Meers P. et al., 2008; Rose S.J. et al., 2014). В настоящее время в клинической практике используется ряд липосомальных препаратов, таких как амфотерицин В и доксорубин. Липосомы, содержащие амфотерицин В, успешно вводились в виде аэрозолей в лёгкие пациентов для лечения грибковых инфекций (Rijnders B. J. et al., 2008). Изучается их использование в ряде заболеваний, включая цитостатические препараты при раке легкого, вазодилататоры при легочной артериальной гипертензии, антибактериальные препараты при хронических инфекциях лёгких, а также кортикостероиды и будесонид при астме, остром повреждении лёгких и остром респираторном дистресс-синдроме (Chang H.I., 2012; Riaz M.K. et al., 2019). Внутривенно введенный амикацин, инкапсулированный в липосомы, как было показано в доклинических моделях, эффективно проникает в лёгкие и макрофаги после однократной дозы (Sercombe L. et al., 2015). Преимущество липосомальных систем состоит в гибкости для регулирования нагрузки лекарственного средства, контроле размеров частиц и их физико-химических свойств, а также параметров, определяющих кинетику высвобождения лекарственного средства (Khuller G.K. et al., 2004). Липосомы действуют как микрорезервуары лекарственных средств, обеспечивая медленное и устойчивое высвобождение лекарственного средства для лечения туберкулёза внутри макрофагов. Они могут быть сконструированы с учетом состава липидов и характеристик заряда, чтобы влиять на их поглощение макрофагами. Системное введение липосом приводит к их накоплению в ретикулоэндотелиальной системе, преимущественно в печени, селезенке, легких, почках, костном мозге и лимфатических узлах. Накопление липосом в ретикулоэндотелиальной системе

позволяет предположить, что прямая доставка инкапсулированных в липосомы антибиотиков в легкие может быть полезной при респираторных заболеваниях, особенно для борьбы с микроорганизмами, обитающими во внутриклеточном пространстве (Sercombe L. et al., 2015; Mossalam M., 2010).

#### **1.4. Особенности БЦЖ-гранулематоза у мышей как модели туберкулёза у человека**

Заражение мышей *M. tuberculosis* – довольно трудоёмкий процесс. Сложность связана с трудностью подбора инфицирующей дозы, при которой разовьется хронический инфекционный процесс, и животное не погибнет от острого течения заболевания. Использование для заражения животных *M. bovis* из вакцины БЖЦ, дополнительно ослабленной длительным культивированием *in vitro*, позволяет гарантированно вызвать хронический гранулематозный процесс. Деструктивные поражения, вызываемые *M. Bovis*, обычно невелики по сравнению с *M. tuberculosis*, но большое количество туберкулёзных гранулём позволяет в достаточной мере оценивать характер процесса.

#### **1.5. Окисленный декстран и его модификации в разработке новых фармацевтических композиций для лечения туберкулёза**

В основе базовой терапии, с которой начинают лечение до получения анализов на чувствительность к антибиотикам, лежит изониазид. Однако применение ГИНК, несмотря на высокую эффективность, значительно ограничено её цитотоксичностью и гепатотоксичностью. Одной из причин этого является малая молекулярная масса изониазида, из-за которой он очень быстро выводится из организма, поэтому для создания постоянного достаточного уровня концентрации и эффективного лечения требуется достаточно частое его применение. Кроме того, ГИНК ограничено проникает в места наибольшего скопления микобактерий – внутрь гранулём (Kjellsson M.C., 2012). Был разработан способ пролонгировать действие ГИНК, целенаправленно доставлять антибиотик в макрофаги и гранулёмы и снижать дозу лекарственного препарата.

Было предложено иммобилизовать изониазид на молекуле полисахарида с молекулярной массой 20-60 кДа. В качестве биосовместимой матрицы выбран декстран, доступный и давно используемый полисахарид, входящий в состав плазмозаменителей. Полученное средство содержит в 1 мл 0,5-5,0 мг ГИНК и 6,0-12,0 мг декстразида (Шкурупий В.А., 2009).

Декстразид изготавливали в два этапа. На первом этапе к 10% водному раствору декстрана с молекулярной массой 40 кДа добавляли концентрированный 40% раствор перекиси водорода, доводя степень окисления декстрана до 5%. Полученную смесь хорошо перемешивали, выливали в емкость с инертным плоским дном и, поместив в сушильный шкаф при температуре 90-95 °С, проводили одновременно сушку и окисление декстрана (Патент № 2618341 Способ получения окисленного декстрана. опубл. 03.05.2017/ В.А. Шкурупий, А.Н. Копылов, А.В. Троицкий).

На втором этапе получали конъюгат из окисленного декстрана и изониазида. В раствор окисленного декстрана в 0,01 М трис-НСl буфере с рН 7,4 вносили порошок изониазида. Смесь суспендировали, нагревали до 100°С и выдерживали 30-60 минут, после чего добавляли нагретый до 60-80°С 96°-й этанол. Выпавший осадок конъюгата промывали этанолом и высушивали. (Патент № 2372914 Фармацевтическая композиция для лечения туберкулёза: опубл. 20.11.2009 / В.А. Шкурупий, А.В. Троицкий, Н.Г. Лузгина, О.В. Потапова).

Фармацевтическая композиция была проверена на мышах и крысах, исследование подтвердило её меньшую токсичность по сравнению с свободным изониазидом (Жарков А.С., 2013; Жарков А.С., 2016).

Декстран в составе гибридной молекулы декстразида увеличивает частоту слияния фагосом с лизосомами и создает в фаголизосоме очень высокие концентрации гидразида изоникотиновой кислоты, но при этом концентрация ГИНК в крови меньше, чем при введении аналогичного количества ГИНК без дополнительных модификаций (Шкурупий В.А., Козяев М.А., 2006; Шкурупий В.А., 2016). Кроме того, существенным положительным отличием является уменьшение частоты введения средства: ГИНК, конъюгированный с декстраном,

достаточно вводить в интермиттирующем режиме 2 раза в неделю. При стандартных схемах терапии изониазид принимается 3 раза в неделю в фазе продолжения терапии, 2-3 раза в сутки в интенсивной фазе терапии.

Помимо непосредственно бактерицидного эффекта изониазида было показано, что декстран может активировать макрофаги и стимулировать фагосомно-лизосомное слияние, преодолевая незавершенный фагоцитоз при туберкулезе. Увеличение функциональной активности клеток приводит к увеличению ГМ КСФ, «пробуждая» спящие L-формы, делая их уязвимыми для изониазида.

Следующим этапом разработки стало помещение комплекса изониазида с декстраном внутрь липосом и исследование ингаляционного способа ведения препарата. Липосомы являются наиболее изученными «транспортными средствами», за счёт их способности локализоваться в определённых типах клеток (Salem I.I. et al., 2005). Инкапсуляция антибиотиков в липосомы усиливает антимикробную активность как в культуре клеток, так и *in vivo* (Khuller G.K. et al., 2004). Одним из главных преимуществ препаратов, инкапсулированных в липосомах, является значительное снижение токсичности (Khuller G. K. et al., 2004). Кроме того, при ингаляционном применении липосомы ограничено всасываются в кровотоки и не оказывают системного действия.

Для изготовления липосомальной формы декстразида в липосомах из фосфатидилхолина «Sigma» размером 200-450 нм размещали декстразид. Для этого очищенный конъюгат изониазида с окисленным декстраном растворяли в 0,01 М Трис-НСl буфере с рН 7,3-7,4 и вносили липосомообразующий агент (Патент № 2372914 Фармацевтическая композиция для лечения туберкулеза: опубл. 20.11.2009 / В.А. Шкурупий, А.В. Троицкий, Н.Г. Лузгина, О.В. Потапова).

Заключение. Персистенция микобактерии туберкулеза в организме человека наносит значительный ущерб человеческой популяции. Распространение ВИЧ-инфекции дополнительно ухудшает ситуацию, т.к. при заражении вирусом иммунодефицита туберкулез является одной из главных оппортунистических инфекций. Появление антибиотиков с антимикобактериальным эффектом

существенно улучшило эпидемиологическую обстановку, однако их использование сопряжено с определёнными труднопреодолимыми ограничениями. Курс лечения даже локализованной инфекции продолжается не менее шести месяцев, а лечение распространённых, генерализованных форм может длиться годами. Препараты для лечения туберкулёза, используемые в клинике в настоящий момент, достаточно токсичны, и их длительный приём наносит ощутимый урон здоровью и самочувствию пациентов. Часть пациентов не выдерживают тяжести побочных эффектов и вынуждены прекратить химиотерапевтическое лечение досрочно. Современным вызовом в терапии туберкулёза стало появление лекарственно-устойчивых форм микобактерии. Часть пациентов заражаются уже формами МБТ с лекарственной устойчивостью, у других резистентность к антибиотикам формируется в результате лечения с погрешностями.

Основной особенностью жизненного цикла МБТ является её персистенция внутри специального временного органа – гранулёмы. Внутри гранулёмы отсутствуют сосуды, а проникновение лекарственных средств путём диффузии в её центр ограничено. Сублетальные концентрации антибиотиков внутри гранулёмы, в том числе, могут способствовать развитию антибиотикорезистентности. Достичь же высоких концентраций внутри паренхимы тканей мешает выраженная токсичность лекарственных препаратов. Данную проблему могла бы решить адресная доставка антибиотиков, что возможно, учитывая, что подавляющее большинство случаев туберкулёза – это лёгочный туберкулёз. Однако в настоящее время отсутствуют ингаляционные формы противотуберкулёзных препаратов.

Всё выше сказанное подводит к тому, что в настоящий момент существует необходимость в проведении научных исследований, результаты которых могли бы послужить основой для создания нового противотуберкулёзного малотоксичного для организма препарата, преодолевающего антибиотикорезистентность МБТ, с возможностью его ингаляционного введения.

## Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Лабораторные животные как объект исследования

Работа выполнена на 105 мышах-самцах линии BALB/c с массой тела 19-22 гр., полученных из питомника ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Мыши линии BALB/c обладают относительно большой продолжительностью жизни и менее склонны к злокачественным образованиям по сравнению с другими инбредными линиями. Кроме того, животные этой линии достаточно спокойны и при длительном совместном содержании избегают драк. Эти характеристики делают их оптимальным выбором для исследования течения длительного инфекционного процесса. Животных содержали в хорошо вентилируемом, отапливаемом помещении на стандартной неограниченной диете со свободным доступом к воде, в общем световом режиме. Эксперименты выполнены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н).

Мыши были разделены на 7 групп по 15 особей в каждой:

- 1 группа – инфицированные БЦЖ;
- 2 группа – инфицированные БЦЖ, с интраперитонеальным введением физраствора в режиме препаратов.
- 3 группа – инфицированные БЦЖ, с введением изониазида интраперитонеально;
- 4 группа – инфицированные БЦЖ, с введением декстразида интраперитонеально;
- 5 группа – инфицированные БЦЖ, с интраперитонеальным введением липосомальной формы декстразида (ЛФД);
- 6 группа – инфицированные БЦЖ, с ингаляционным введением ЛФД,
- 7 группа – интактные мыши

В работе была использована модель БЦЖ-гранулематоза. Мышей инфицировали путем ретроорбитального введения 0,5 мг микробных тел –

микобактерий туберкулёза из вакцины БЦЖ на 1 животное в 0,2 мл 0,85% водного раствора NaCl. Спустя 3 месяца после инфицирования мышам начинали вводить различные фармацевтические композиции 2 раза в неделю в течение 6 месяцев. Доза по изониазиду всех фармацевтических композиций составляла 14 мг/кг массы тела. Все использованные фармацевтические композиции перед введением разводились дистиллированной водой до получения объема 0,0025 мл/1 гр массы тела.

Для изучения лечебного влияния на модели БЦЖ-гранулематоза были выбраны следующие фармацевтические композиции:

- Изониазид, как стандартное в настоящее время лекарственное средство, препарат первой линии для лечения туберкулёза. Исследование его влияния на мышей, зараженных БЦЖ, проводили для сравнения эффективности и количества побочных эффектов по сравнению с новыми фармацевтическими композициями на основе окисленного декстрана. В данной работе использовался изониазид производителя «Fluka Analytical».

- Декстразид, ранее были проведены успешные исследования, показавшие эффективность декстразида в лечении БЦЖ-гранулематоза в сравнении с чистым изониазидом, однако не были изучены его антимикобактериальные свойства и токсические эффекты в течение длительного времени. В данной работе использовался декстразид, предоставленный Троицким А.В. и Быстровой Т.Н., изготовленный по технологии, описанной в патенте RU № 2618341 (Шкурупий В.А., 2016).

- Липосомальная форма декстразида (ЛФД). Ранее не проводилось исследований влияния липосомальной формы декстразида при БЦЖ-гранулематозе. Кроме того, впервые исследована ингаляционная форма ЛФД, её действие на персистирующих в тканях микобактерий и выраженность токсических эффектов. ЛФД для данной работы так же была изготовлена и предоставлена Троицким А.В. и Быстровой Т.Н. (Патент № 2372914 В.А. Шкурупий В.А., 2009). Сначала изготавливались липосомы из фосфатидилхолина производителя «Sigma», а затем в них размещали декстразид.

Сбор биологических образцов проводили через два и шесть месяцев после начала введения препаратов.

Все фармацевтические композиции (ГИНК, декстраид, ЛФД) вводили интраперитонеально, кроме того, ЛФД дополнительно вводили ингаляционно, для оценки эффективности данного способа введения. Интраперитонеальный способ введения средств был выбран как приближенный по эффекту к внутривенному, но технически гораздо проще осуществимый. Подавляющее число (97%) случаев туберкулёза – это легочная форма (Васильева И.А. и др., 2017), и её лечению уделяется особое внимание. Предполагалось, что при ингаляционном способе введения фармацевтические композиции будут доставляться непосредственно к инфекционному очагу, что позволит повысить в нем уровень лечебных средств и уменьшить системные побочные эффекты. В работе использовалась ЛФД для проверки гипотезы, что она лучше захватывается макрофагами и дольше задерживается внутри клеток.

Доза ЛФД при ингаляционном введении была такой же, как и при интраперитонеальном введении. Мышей извлекали из камеры сразу после испарения ингалируемой ЛФД. Использовали камеру с ультразвуковым ингалятором «Муссон» при комнатной температуре. Животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом.

## **2.2. Подготовка печени и лёгких к исследованию**

В качестве материала исследования использовали печень и лёгкие мышей, так как при БЦЖ-гранулематозе наибольшее количество изменений наблюдается в этих паренхиматозных органах. Органы фиксировали сразу после извлечения в 10% изотоническом водном растворе формалина с последующей стандартной гистологической обработкой образцов органа. Использовали станцию гистологической проводки STP-120 (Thermo-Scientific, USA) и станцию для заливки в парафин EC-350 (ThermoScientific, USA), изготавливали гистологические срезы толщиной 4-5 мкм с помощью микротомы Microm (ThermoScientific, USA), для иммуногистохимической окраски срезов

использовались предметные стекла с полилизинном, для импрегнации серебром – предметные стекла Superfrost (ThermoScientific, USA). Иммуногистохимическая окраска срезов производилась в ручном режиме.

### **2.3. Методы гистологической окраски и морфометрии печени и лёгких**

Оценивали количественную плотность ( $N_{ai}$ ) и диаметр гранулём. Определяли абсолютное число гранулём во всех полях зрения и вычисляли их среднюю плотность на единицу площади, а также диаметр каждой гранулёмы. Для оценки объемной плотности гранулём и инфильтратов ( $V_v$ ) определяли процент площади занимаемой каждой гранулёмой и очаговым инфильтратом в тестовой площади. Количество локусов деструкции оценивали, подсчитывая во всех полях зрения относительное количество клеток в состоянии дистрофии на единицу тестовой площади.

Оценку объемной плотности, количественной плотности ( $N_{ai}$ ), объемной плотности и диаметра гранулем, оценку объемной плотности инфильтратов и локусов деструкции в печени и легких производили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином по следующей методике:

- 1) срезы дважды депарафинизировали в ксилоле в течении 3 минут;
- 2) дважды регидратировали в 96% этаноле течении 3 минут;
- 3) быстро промывали в дистиллированной воде
- 4) помещали на 5 минут вводный раствор гематоксилина Карацци;
- 5) срезы промывали под проточной водой в течении 5 минут;
- 6) помещали в водно-спиртовой раствор эозина на 5 минут;
- 7) срезы промывали в спиртах восходящей концентрации (50% - 1 минута, 70% - 1 минута; 96% - 3 минуты; 96% - три минуты)
- 8) срезы промывали дважды по 3 минуты в ксилоле;
- 9) заключали срезы под покровной средой «BioMount» (BioVitrum).

Коллагены I и III типа – фибриллярные белки, обладающие большой механической прочностью, они – основа соединительной ткани и межклеточного матрикса. Но из-за побочных эффектов лекарств и патологического иммунного ответа на воспаление их часто вырабатывается слишком много, что приводит к фибротическим осложнениям. Оценивали объемную плотность пучков коллагеновых волокон в интерстиции органов и внутри гранулём. Определяли количество пучков на единицу площади во всех полях зрения.

Оценку количества коллагеновых волокон в печени и легких производили на срезах, окрашенных пиррофуксином по ван Гизону по следующей методике:

- 1) срезы дважды депарафинизировали в ксилоле в течении 3 минут;
- 2) дважды регидратировали в 96% этаноле течении 3 минут;
- 3) быстро промывали в дистиллированной воде;
- 4) стекла обсушивали фильтровальной бумагой и располагали горизонтально;
- 5) наносили на срезы по 5 капель железного гематоксилина по Вейгерту А и железного гематоксилина по Вейгерту В, оставляли на 10 минут;
- 6) промывали образцы в проточной воде в течение 10 минут;
- 7) наносили по 10 капель пиррофуксина по Ван-Гизону, оставляли на 10 минут;
- 8) быстро промывали в дистиллированной воде;
- 9) срезы промывали в спиртах восходящей концентрации (50% - 1 минута, 70% - 1 минута; 96% - 3 минуты; 96% - три минуты);
- 10) срезы промывали дважды по 3 минуты в ксилоле;
- 11) заключали срезы под покровной средой «BioMount» (BioVitrum).

Оценивали объемную плотность ретикулярных волокон в интерстиции органов и внутри гранулём. Определяли количество волокон на единицу площади во всех полях зрения.

Оценку количества ретикулярных волокон в печени и легких производили при помощи импрегнации серебром по следующей методике:

- 1) срезы дважды депарафинизировали в ксилоле в течении 3 минут;
- 2) срезы дважды регидратировали в 96% этаноле течении 3 минут;
- 3) быстро промывали срезы в дистиллированной воде;
- 4) стекла обсушивали фильтровальной бумагой и располагали горизонтально;
- 5) наносили на срезы по 5 капель раствора перманганата калия и 5 капель раствора кислотного буфера, оставляли на 5 минут;
- 6) быстро промывали срезы в дистиллированной воде;
- 7) наносили на срезы 10 капель раствора щавелевой кислоты, оставляли на 3 минуты;
- 8) быстро промывали срезы в дистиллированной воде;
- 9) наносили на срезы 10 капель раствора ферроаммония сульфата, оставляли на 3 минуты;
- 10) дважды промывали срезы в дистиллированной воде;
- 11) наносили на срезы 10 капель раствора аммиачного серебра, оставляли на 3 минуты;
- 12) быстро промывали срезы в дистиллированной воде;
- 13) наносили на срезы 10 капель раствора нейтрального формалина, оставляли на 5 минуты;
- 14) дважды промывали срезы в дистиллированной воде;
- 15) наносили на срезы 10 капель фиксирующего раствора гипосульфита натрия, оставляли на 5 минут;
- 16) промывали срезы в проточной воде в течение 5 минут;

17) срезы промывали в спиртах восходящей концентрации (50% - 1 минута, 70% - 1 минута; 96% - 3 минуты; 96% - три минуты);

18) срезы промывали дважды по 3 минуты в ксилоле;

19) заключали срезы под покровной средой «BioMount» (BioVitrum).

Для иммуногистохимического исследования использовали непрямой стрептавидин-пероксидазный метод с применением тест-системы для визуализации производителя Abcam для оценки: количества МБТ, количества коллагенов разных типов, активности металлопротеиназ и их ингибиторов, активности воспаления. Использовали специфичные первичные антитела и тест-систему производителя Abcam.

При выборе панели антител, для изучения эффекта использованных фармацевтических средств учитывали, что при поражении тканей микобактериями происходит ремоделирование внеклеточного матрикса. Для оценки изменения состояния матрикса исследовали активность металлопротеиназ и ингибитора металлопротеиназ.

Активность воспаления, вызванного персистенцией МБТ, оценивали при помощи провоспалительных цитокинов TNF-alpha и IL-6. TNF-alpha – один из важнейших факторов защиты от внутриклеточных паразитов, которым является МБТ. IL-6 – провоспалительный цитокин, вырабатываемый активированными макрофагами и фибробластами и стимулирующий иммунный ответ.

Таблица 1. Характеристика использованных первичных антител

Маркер	Антитела (Клон, производитель)	Характеристика антител	Локализация реакции	Разведение
МБТ	Anti-Mycobacterium tuberculosis (Abcam 905)	Оценка количества МБТ в тканях	Окраска микобактерий	1:100
ММР9	Anti-MMP9 (Abcam 38898)	Оценка разрушения матрикса	внеклеточное пространство,	1:200

			цитоплазма	
MMP1	Anti-MMP1 (Abcam 38929)		внеклеточное пространство, цитоплазма	1:100
TIMP1	Anti-TIMP1 (Abcam 211926)		внеклеточное пространство, цитоплазма	1:200
TNF- $\alpha$	Anti-TNF-alpha (Abcam 6671)	Оценка экспрессии провоспалительных цитокинов	цитоплазма	1:100
IL-6	Anti-IL-6 (Abcam 7737)		цитоплазма	1:100

Иммуногистохимическое исследования выполняли по следующей методике:

- 1) срезы толщиной 4,5 мкм срезы дважды депарафинизировали в ксилоле в течении 3 минут;
- 2) срезы дважды регидратировали в 96% этаноле течении 3 минут;
- 3) быстро промывали срезы в дистиллированной воде;
- 4) выполняли демаскировку антигенов, нагревая срезы в растворе цитратного буфера в микроволновой печи мощностью 600 Вт в течении 15 минут;
- 5) срезы промывали в фосфатном буфере (PBS) дважды;
- 6) производили блокирование 3% перекисью водорода эндогенной пероксидазы в течении 15 минут;
- 7) срезы промывали 4 раза по 5 минут в PBS;
- 8) в течении 15 минут выполняли экспозицию с блокирующей сывороткой;
- 9) срезы промывали 4 раза по 5 минут в PBS;
- 10) на промытые срезы наносили первичные антитела в соответствующем разведении. Время экспозиции с первичными антителами составляло 35 минут при температуре 34°C;
- 11) срезы промывали 4 раза по 5 минут в PBS

- 12) срезы инкубировали со вторичными антителами с пероксидазным комплексом в течении 15 минут;
- 13) срезы промывали 4 раза по 5 минут в PBS;
- 14) наносили на срезы DAB-субстрат для визуализации пероксидазной метки;
- 15) дополнительно докрашивали гематоксилином Карацци,
- 16) промывали срезы в проточной воде в течение 5 минут;
- 17) срезы промывали в спиртах восходящей концентрации (50% - 1 минута, 70% - 1 минута; 96% - 3 минуты; 96% - три минуты);
- 18) срезы промывали дважды по 3 минуты в ксилоле;
- 19) заключали срезы под покровной средой «BioMount» (BioVitrum).

Анализ гистологических образцов проводили с помощью микроскопа AxioImager A1 с фотокамерой AxioCam Mrc (Carl Zeiss), при помощи программы AxioVision (rel.4.7). Данная программа позволяет сделать фотографии срезов целиком и выбранных полей зрения. Затем при помощи данной программы на фотографии срезов накладывали координатную сетку и выполняли морфометрию исследованных препаратов. Для морфометрии использовали закрытую тестовую систему из 100 регулярно расположенных точек площадью  $3,64 \times 10^5$  мкм<sup>2</sup> (Автандилов, 2000). Оценка проводилась при увеличении  $\times 200$ .

Объёмную плотность структур рассчитывали по формуле:

$$V_v = P_i / P_t,$$

где  $P_i$  – количество точек тестовой системы, попавших на профиль исследуемой структуры;  $P_t$  – общее количество точек тестовой системы.

Численную плотность структур рассчитывали по формуле:

$$N_{ai} = N_{ti} / A_t,$$

где  $N_{ti}$  – количество исследуемых структур, попавших в тестовую плотность  $A_t$ .

Оценка критериев экспрессии молекулярно-биологических маркеров проводилась согласно общепринятым методикам и протоколам производителей (таблица 1). Количество МБТ, уровень экспрессии металлопротеиназ и ингибитора металлопротеиназ и провоспалительных цитокинов определяли при помощи программы ImageJ (ИНС Toolbox). Эта программа позволяет оценить процент позитивно окрашенных клеток (не менее, чем на 1000 клеток), таким образом предоставив возможность сравнить группы по выбранным мишеням антител. Оценка проводилась при увеличении  $\times 400$ .

#### **2.4. Методы статистической обработки полученных данных**

Проводили сравнение 5 группы (ЛФД, основного исследуемого препарата) с 3 группой (ГИНК), как со стандартом лечения туберкулёза в настоящий момент, с 4 группой (декстразид) как с более старой формой данного фармацевтического средства и 7 группой (здоровые мыши) Так же сравнивали между собой два способа введения ЛФД: ингаляционно и интраперитонеально.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 12.0 (StatSoft, США). Для оценки межгрупповых различий использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса для множественного сравнения, при обнаружении статистически значимых различий между группами далее проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. Результаты представлены как средняя величина показателя и его среднеквадратичное отклонение ( $M \pm SD$ ). Вероятность справедливости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимали при 5% уровне значимости ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Влияние композиций изониазида на морфофункциональные показатели легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом

#### 3.1.1 Количество *Mycobacterium bovis* в лёгких мышей после введения различных композиций изониазида.

В таблице 2 представлены результаты исследования количества МБТ в паренхиме легких мышей с БЦЖ-гранулематозом, с введением стандартным лекарственным препаратом изониазидом (ГИНК), а также разработанными фармацевтическими средствами, включающими комплекс изониазида с окисленным декстраном и его липосомальную форму.

Все вводимые в течение 2 месяцев фармацевтические средства показали себя эффективными в элиминации МБТ. У животных 3,4,5,6 групп наблюдали уменьшение общего количества МБТ. При введении ГИНК общее количество МБТ снизилось в 3,8 раза по сравнению со 2 группой. При введении декстразида и ЛФД количество МБТ снизилось в 2,5 и в 3,3 раза соответственно по сравнению со 2 группой. Ингаляционное введение в данном случае показало себя эффективнее интраперитонеального, количество МБТ по сравнению с 5 группой снизилось в 1,3 раза. Достоверных различий в эффективности между разными средствами не выявлено.

При исследовании количества и локализации МБТ в лёгких экспериментальных животных после 2 месяцев введения препаратов, определено, что большая часть микобактерий обнаруживалась внутри макрофагов гранулем, небольшое количество было найдено в свободных макрофагах вне гранулем. В 1 и 2 группах, не получавших формы изониазида, в свободных макрофагах располагалось около 30% МБТ (Рис.1).



Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

$\beta$  - достоверные различия между 4 и 5 группами;

$\alpha$ - достоверные различия между 5 и 6 группами;

Введение ГИНК показало себя особенно эффективно в отношении элиминации МБТ в свободных макрофагах, в 3 группе только 3,5% МБТ были найдены в свободных макрофагах. В 4 и 5 группах в макрофагах гранулём располагалось около 80% МБТ. Введение ЛФД ингаляционно также показало себя эффективно в отношении МБТ, располагающихся в свободных макрофагах, в 6 группе в них располагалось только 7% МБТ.

После 6 месяцев введения препаратов в паренхиме лёгких всех групп экспериментальных животных МБТ не определялись.

### *3.1.2 Характеристика морфологических изменений паренхимы легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

Через пять месяцев после заражения в ткани лёгких мышей определяли туберкулёзные гранулёмы, состоящие из макрофагов и эпителиоидных клеток. В основном, гранулёмы располагались перибронхиально и периваскулярно. Наиболее выраженными были изменения в группах без введения препаратов (Рис.2). Введение всех формам изониазида показало статистически значимые различия по сравнению со 2 группой (Таблица 3).

После 2 месяцев введения препаратов численная плотность гранулём в 3, 4 и 5 группах по сравнению со второй группой уменьшилась в 2,6, 1,7 и в 2,4 раза соответственно. Статистически значимой разницы в сравнении 4 и 5 группы с 3 не было. Так же одинаковый результат был получен для 5 и 6 групп.

Средний диаметр гранулём после 2 месяцев введения препаратов не отличался от контроля в 3 и 4 группах. Но при введении ЛФД, данный параметр уменьшался на 25% сравнению со 2 и 3 группой. Так же диаметр гранулём уменьшался в 1,3 раза в 6 группе по сравнению с 5 группой.

Таблица 3. Результаты исследования лёгких мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно (M±m)

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
NaI гранулём, на поле зрения	2 мес	2,7±0,15	2,6±0,32	1±0,21*	1,5±0,2*	1,1±0,16*	1,1±0,13	–	p<0,0001 p3-p2<0,0001 p4-p2<0,0001 p5-p2<0,0001
	6 мес	–	–	–	–	–	–	–	
Диаметр гранулём, мкм	2 мес	28,21±9,94	29,35±8,27	28,32±9,98	24,21±3,69	21,48±3,41*#	16,65±3,46 α	–	p<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p5<0,0001 p5-p6<0,0001
	6 мес	–	–	–	–	–	–	–	
Vv гранулём, на поле зрения	2 мес	6,3±0,72	6±0,92	3,2±0,51*	4,22±0,48*#	3,3±0,47* β	2,16±0,41 α	–	p<0,0001 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,0001 p4-p5<0,0001 p5-p6<0,0001
	6 мес	–	–	–	–	–	–	–	
Vv инфильтратов, на поле зрения	2 мес	5,02±0,21	5,3±0,34	3,56±0,28*	4,17±0,42*	3,3±0,35*	2,31±0,25 α	0,53±0,08	p<0,0001 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,001 p2-p5<0,0001 p5-p6<0,001

									p<0,0001
	<b>6 мес</b>	3,4±0,27	3,3±0,42	2,6±0,19*	2,4±0,31*	1,8±0,25*#	1,2±0,32 $\alpha$	–	p2-p3<0,01 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p5<0,0001 p5-p6<0,0001

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

$N_{ai}$  – численная плотность;  $V_v$  – объёмная плотность;

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

$\beta$  - достоверные различия между 4 и 5 группами;

$\alpha$ - достоверные различия между 5 и 6 группами;

Объемная плотность гранулём после 2 введения препаратов была меньше во всех группах, получавших формы изониазида. По сравнению со 2 группой данный показатель был меньше в 1,9, 1,4 и в 1,8 раза соответственно по сравнению с 3, 4 и 5 группой. Декстразид показал себя хуже остальных, объёмная плотность гранулём была больше на 25% по сравнению с 3 группой и на 20% больше по сравнению с 5 группой. ЛФД, вводимая ингаляционно показала себя эффективнее, этот показатель был меньше на 35% чем в 5 группе.

Объёмная плотность воспалительных инфильтратов в паренхиме лёгких после 2 месяцев введения препаратов была значительно больше во всех группах по сравнению с 7 группой. Введение всех форм изониазида уменьшало количество инфильтратов, но оно оставалось больше, чем в группе отрицательного контроля. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 33%, 20% и на 37% соответственно в группах 3, 4 и 5. Статистически значимых отличий между 3 и 5 группе не было. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимо уменьшило объёмную плотность инфильтратов на 30%.

После 6 месяцев введения препаратов в паренхиме лёгких гранулём не было обнаружено, поэтому средний диаметр гранулём, численная и объёмная плотности гранулём не были исследованы. Объёмная плотность инфильтратов после 6 месяцев введения форм изониазида значительно уменьшилась, но всё равно осталось больше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 20%, 27% и на 45% соответственно в группах 3, 4 и 5. Объёмная плотность инфильтратов была меньше на 30% в 5 группе по сравнению с 3. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объёмную плотность инфильтратов на 33%.

Кроме того, была исследована структура паренхимы лёгких и определена общая площадь участков ателектаза и эмфиземы (Таблица 4).

Таблица 4. Результаты исследования паренхимы лёгких мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно ( $M \pm m$ )

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
Vv ателектаза+эмфиземы, на поле зрения	2 мес	8,06±8,82	9,35±10,94	4,3±6,94*	4,78±6,23*	3,61±5,82*# β	3,17±5,84	2,48±3,92	p<0,0001
		74/26%	64/36%	58/42%	66/34%	33/67%	55/45%	31/61%	p2-p3<0,003 p2-p4<0,04 p2-p5<0,001 p3-p5<0,001 p4-p5<0,001
	6 мес	24,6±7,4	24,2±9,43	16,5±7,12*	15,03±7,75*	11,2±7,01*#	10,1±8,19	-	p<0,0001
		43/57%	67/33%	47/53%	54/46%	41/69%	60/40%		p2-p3<0,0001 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p5<0,0001

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

Na<sub>i</sub> – численная плотность; V<sub>v</sub> – объёмная плотность; \* – достоверные различия по сравнению с 2 группой, # - достоверные различия по сравнению с 3 группой; β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами;

После 2 месяцев введения препаратов по всей площади лёгких во всех группах встречались зоны ателектаза и эмфиземы. Введение всех композиций изониазида позволяло уменьшить площадь повреждённой ткани. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 54%, 49% и на 60% соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность эмфиземы и ателектазов в 5 группе была меньше на 18% и на 25% по сравнению с 3 и 4 группой соответственно. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность эмфиземы и ателектазов на 12%.

После 6 месяцев введения препаратов так же была исследована структура паренхимы лёгких и определена общая площадь участков ателектаза и эмфиземы. Введение всех композиций изониазида уменьшило площадь повреждённой ткани по сравнению с предыдущей точкой исследования. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 32%, 38% и на 54% соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность эмфиземы и ателектазов была меньше на 32% в 5 группе по сравнению с группой 3. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

### *3.1.3. Состояние соединительной ткани паренхимы легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

Микобактериальная инфекция и введение всех композиций изониазида повлекло за собой ремоделирование соединительной ткани лёгких, а также изменения в соединительнотканной структуре гранулём. Наиболее выраженными были изменения в группах, не получавших формы изониазида (Рис.3). На разных сроках было исследовано количество коллагеновых и ретикулярных волокон в гранулёмах и паренхиме лёгких при помощи специфических окрасок: по Ван-Гизон и импрегнация серебром соответственно (Таблица 5).

Таблица 5. Результаты исследования соединительной ткани лёгких мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно ( $M \pm m$ )

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
Vv Коллагеновые волокна в гранулёмах, на поле зрения	2 мес	2,79±0,21	2,9±0,17	3,83±0,46*	3,4±0,32*	3,1±0,32#	3,2±0,2	-	p<0,0000 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,02 p3-p5<0,0006
	6 мес	-	-	-	-	-	-	-	
Vv Коллагеновые волокна в интерстиции, на поле зрения	2 мес	4,12±0,41	4,08±0,38	5,4±0,63*	3,22±0,84*#	2,4±0,64*# β	2,02±0,36	0,43±0,09	p<0,0000 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,001 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,0001 p3-p5<0,003 p4-p5<0,002
	6 мес	8±1,59	8,46±1,81	10,4±1,78*	2,76±1,08*#	2,09±1,04*#	1,84±1,14 α		p<0,0000 p2-p3<0,000 p2-p4<0,000 p2-p5<0,000 p3-p4<0,000 p3-p5<0,000 p5-p6<0,000
% Ретикулярные волокна в гранулёмах, от поля зрения	2 мес	9,46±1,3	9,22±1,46	9,3±2,75	5,4±1,5*#	4,5±1,38*# β	4,14±1,08 α	-	p<0,0000 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,003

									p3-p5<0,02 p4-p5<0,006 p5-p6<0,05
	<b>6 мес</b>	–	–	–	–	–	–	–	
<b>% Ретикулярные волокна в интерстиции, от поля зрения</b>	<b>2 мес</b>	19,95±3,41	20,59±3,21	18,2±2,4	18,27±3,13	19,8±2,45	18,67±2,6	19,99±2,5	p = 0,4295
	<b>6 мес</b>	20,3±1,66	21,94±1,81	21,53±2,05	18,9±1,65	18,84±2,22	18,7±1,34	–	p = 0,2364

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

Na<sub>i</sub> – численная плотность; V<sub>v</sub> – объёмная плотность;

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами;

Введение препаратов в течение 2 месяцев привело к увеличению количества коллагеновых волокон на 24% и на 15% соответственно в группах 3 и 4 по сравнению с группой без введения препаратов. Объемная плотность коллагеновых волокон в гранулёмах в 5 группе была меньше на 20% сравнению с группой 3 и без статистически значимых различий со 2 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 2 месяцев введения препаратов объемная плотность коллагеновых волокон в интерстиции по сравнению со 2 группой снизилась на 22% и на 41% при введении декстразида и ЛФД соответственно, но повысилась на 24% при введении ГИНК. Данный параметр был на 25% меньше в 5 группе, по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным показало сравнимую объемную плотность коллагена в интерстиции. Введение декстразида и ЛФД снизило количество коллагеновых волокон, но оно осталось гораздо больше, чем у здоровых животных.

Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах по сравнению со 2 группой снизилось на 42% и на 51% в группах 4 и 5 соответственно. По сравнению с 3 группой количество ретикулярных волокон в 4 и 5 группе уменьшилось соответственно на 43% и 52%, статистически значимой разницы между 2 и 3 группой не было. Данный параметр был на 17% меньше в 5 группе, по сравнению с 4. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность коллагена на 9%.

После 6 месяцев введения препаратов гранулём во всех группах заражённых мышей не было обнаружено.

Объемная плотность коллагеновых волокон в интерстиции после 6 месяцев введения препаратов была максимальной в 3 группе: в 1,3 раза больше, чем во 2 группе, в 3,7 раза больше чем в 4 группе и в 5 раз больше чем в 5 группе. По сравнению с группой без введения препаратов данный параметр был в 3 раза и в 4 раза меньше чем в 4 и 5 группе соответственно. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность коллагена на 12%.

Объемная плотность ретикулярных волокон в интерстиции во всех группах, включая контроль без введения препаратов и здоровых животных была одинаковой после 2 и после 6 месяцев введения форм изониазида.

Для исследования состояния соединительной ткани паренхимы легких так же было выполнено ИГХ исследование на MMP 9, MMP 1 и TIMP 1 (Таблица 6).

После 2 месяцев введения всех форм изониазида отмечалось снижение объемной плотности MMP 9, однако уровень MMP 9 остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 2,5, 2 и в 3,2 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность MMP 9 в 5 группе была меньше на 20% чем в 3 группе и на 37% меньше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность MMP 9 на 30%.

После 2 месяцев введение всех форм изониазида показало снижение объемной плотности MMP 1, однако её уровень остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 2,4, 1,9 и в 2,8 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность MMP 1 в 5 группе была меньше на 16% чем в 3 группе и на 32% меньше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность MMP 1 на 34%.

Таблица 6. Результаты исследования уровня ММР 1, ММР 9, TIMP 1 в лёгких мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно (M±m)

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
% ММР 9, на поле зрения	2 мес	8,3±0,49	8,6±0,36	3,4±0,52*	4,3±0,25*	2,7±0,19*# β	1,9±0,14 α	1,3±0,12	p<0,0001 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p5<0,002 p4-p5<0,0001 p5-p6<0,001
	6 мес	4,6±1,54	4,4±1,53	4,1±1,19	3,5±1,05*#	1,96±0,61*# β	1,74±1,03	-	p<0,0001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,02 p3-p5<0,0001 p4-p5<0,001
% ММР 1, на поле зрения	2 мес	10,4±0,16	10,9±0,23	4,5±0,8*	5,6±0,26*	3,8±0,56*# β	2,5±0,28 α	1,9±0,42	p<0,0001 p2-p3<0,0001 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p5<0,002 p4-p5<0,004 p5-p6<0,02
	6 мес	5,1±1,27		4,5±1,01	4,1±1,08*	2,5±0,99*# β	2±0,65 α	-	

			5,4±1,75						p2-p4<0,02 p2-p5<0,03 p3-p5<0,02 p4-p5<0,01 p5-p6<0,03
% TIMP 1, на поле зрения	2 мес	3,2±0,52	3,2±0,52	5,3±0,52*	4,2±0,3*	6,4±0,24*#β	6,9±0,27	7,4±0,31	p<0,001 p2-p3<0,02 p2-p4<0,02 p2-p5<0,01 p3-p5<0,03 p4-p5<0,03
	6 мес	4,73±1,25	4,3±1,25	5±1,18	4,9±1,21	6,5±1,97*#β	7±1,71	–	p<0,01 p2-p5<0,01 p3-p5<0,002 p4-p5<0,002

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами;

После 2 месяцев введения всех форм изониазида отмечалось повышение объемной плотности ТИМР 1, но её уровень остался ниже, чем у здоровых мышей во всех группах, кроме 6. Данный параметр по сравнению со второй группой был больше на 40%, 24% и на 50% соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность ТИМР 1 в 5 группе была больше на 17% чем в 3 группе и на 34% больше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 6 месяцев введения всех форм изониазида уровень ММР 9 статистически значимо не отличался между 2 и 3 группой, но по сравнению со второй группой был меньше на 20%, и 45% соответственно в группах 4 и 5. Объемная плотность ММР 9 в 5 группе была меньше на 52% чем в 3 группе и на 44% меньше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 2 месяцев введения всех форм изониазида отмечалось снижение объемной плотности ММР 1 в группах 4 и 5 на 24% и 54% соответственно по сравнению со 2 группой, отличий между 2 и 3 группой не выявлено. Объемная плотность ММР 1 в 5 группе была меньше на 44% чем в 3 группе и на 39% меньше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность ММР 1 на 20%.

После 6 месяцев введения всех форм изониазида отмечалось повышение объемной плотности ТИМР 1 только для животных получавших ЛФД. Данный параметр в 5 группе по сравнению со второй группой был больше на 34%, по сравнению с 3 группой – больше на 23%, по сравнению с 4 группой – на 25%. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимой разницы не показало.

*3.1.4. Характеристика процессов воспаления в паренхиме легких экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

В следствие персистенции микобактериальной инфекции в тканях повышался уровень провоспалительных цитокинов. Для оценки интенсивности воспаления были исследованы объемные плотности провоспалительных цитокинов - TNF- $\alpha$  и IL-6 на разных сроках введения различных форм изониазида (Таблица 7). Наибольшая активность провоспалительных цитокинов определена возле и внутри гранулём, в областях лимфоидных инфильтратов в группах без введения препаратов (Рис.4).

Введение всех форм изониазида показало эффективность в снижении объемной плотности TNF- $\alpha$ , однако уровень TNF- $\alpha$  остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 1,3, 2,1 и в 3 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность TNF- $\alpha$  была меньше на 40% в 4 группе и на 65% в 5 группе по сравнению с группой 3 и на 40% меньше в 5 группе по сравнению с 4. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

Изменение уровня IL-6 в ходе введения всех композиций изониазида было сходно с уровнем TNF- $\alpha$ , за исключением отсутствия статистически значимой разницы между 2 и 3 группами. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 36% и на 72% соответственно в группах 4 и 5. Объемная плотность IL-6 была меньше в 3,8 раза в 5 группе и в 1,7 раза в 4 группе по сравнению с группой 3, а так же на 44% меньше в 5 группе по сравнению с 4. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

Таблица 7. Результаты исследования уровня TNF- $\alpha$ , IL-6 в лёгких мышцах, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно (M $\pm$ m)

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
% TNF- $\alpha$ , на поле зрения	2 мес	11,2 $\pm$ 1,57	12,6 $\pm$ 1,49	8,7 $\pm$ 1,91*	5,2 $\pm$ 1,56*#	3,1 $\pm$ 1,37*# $\beta$	3,8 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,49	p<0,0001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,0001 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,001 p3-p5<0,0001 p4-p5<0,001
	6 мес	4,96 $\pm$ 0,99	6,2 $\pm$ 1,54	4,6 $\pm$ 1,4*	3,5 $\pm$ 1*#	1,8 $\pm$ 0,76*# $\beta$	1,7 $\pm$ 0,9	–	p<0,001 p2-p3<0,002 p2-p4<0,003 p2-p5<0,003 p3-p4<0,02 p3-p5<0,004 p4-p5<0,002
% IL-6, на поле зрения	2 мес	9,3 $\pm$ 1,8	9,7 $\pm$ 1,46	10,5 $\pm$ 2,02	6,2 $\pm$ 1,42*#	2,7 $\pm$ 0,94*# $\beta$	2,5 $\pm$ 1,03	0,3 $\pm$ 0,4	p<0,001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,002 p3-p4<0,003 p3-p5<0,003 p4-p5<0,003
	6 мес	4,4 $\pm$ 1,7	4,4 $\pm$ 1,2	5,3 $\pm$ 1,3	3,7 $\pm$ 0,9*#	1,7 $\pm$ 1*# $\beta$	1,5 $\pm$ 1,1	–	p<0,001

									p2-p4<0,01 p2-p5<0,01 p3-p4<0,002 p3-p5<0,003 p4-p5<0,003
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами;

После 6 месяцев введения препаратов общий уровень провоспалительных цитокинов снизился, но остался выше, чем у здоровых животных. Уровень TNF- $\alpha$  по сравнению со второй группой был меньше 25%, 44%, и на 71% соответственно в группах 4 и 5. Объемная плотность TNF- $\alpha$  была меньше на 24% в 4 группе и на 61% в 5 группе по сравнению с группой 3. Данный показатель был меньше на 49% в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимой разницы не показало.

После 6 месяцев введения препаратов уровень IL-6 по сравнению со второй группой был меньше 16% и на 61% соответственно в группах 4 и 5. Объемная плотность IL-6 была меньше на 30% в 4 группе и на 68% в 5 группе по сравнению с группой 3. Данный показатель был меньше на 54% в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

### **3.2. Влияние композиций изониазида на морфофункциональные показатели печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом**

#### *3.2.1 Количество *Mycobacterium bovis* в печени после введения различных композиций изониазида.*

Введение всех форм изониазида всеми способами показало себя эффективным в элиминации МБТ в печени экспериментальных животных на разных сроках (Таблица 8). Микобактерии при исследовании обнаруживались внутри свободных макрофагов и макрофагов гранулём, наибольшее количество МБТ было зафиксировано в группах, не получавших препараты (Рис.5). К 6 месяцу введения форм изониазида МБТ в свободных макрофагах остались только в группах без введения форм изониазида.



	<b>6 мес</b>	3,15±0,2	3,4±0,19	1,93±0,09*	0,96±0,07*	1,15±0,09*#	0,69±0,08 $\alpha$		p2-p3<0,01 p2-p4<0,02 p2-p5<0,003 p3-p5<0,002 p5-p6<0,01
<b>% M.tb. в свободных макрофагах, на поле зрения</b>	<b>2 мес</b>	1,59±0,1	2,03±0,09	0,16±0,02*	0,41±0,42*#	0,1±0,08*#	0,13±0,01 $\alpha$		p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,003 p3-p4<0,001 p3-p5<0,03 p5-p6<0,04
	<b>6 мес</b>	0,34±0,01	0,4±0,02	–	–	–	–		

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

$\beta$  - достоверные различия между 4 и 5 группами;

$\alpha$ - достоверные различия между 5 и 6 группами.

После 2 месяцев введения всех форм изониазида у животных 3,4,5,6 групп наблюдали статистически значимое уменьшение общего количества МБТ. При введении ГИНК общее количество МБТ снизилось в 2,1 раза по сравнению со 2 группой. При введении декстразида и ЛФД количество МБТ снизилось в 2,5 и в 3,7 раза соответственно по сравнению со 2 группой. Объемная плотность общего количества МБТ была меньше на 16% в 4 группе и на 43% в 5 группе по сравнению с группой 3. Данный показатель был меньше на 32% в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение в данном случае не показало себя эффективнее интраперитонеального.

При исследовании количества и локализации МБТ в печени экспериментальных животных после 2 месяцев введения форм изониазида, определено, что большая часть микобактерий обнаруживалась внутри макрофагов гранулем, небольшое количество было найдено в свободных макрофагах вне гранулем. В 1 и 2 группах, не получавших препаратов, в свободных макрофагах располагалось около 27% МБТ. Введение ЛФД и ГИНК показало себя особенно эффективно в отношении элиминации МБТ в свободных макрофагах, в 3 и 5 группах только 5,5% МБТ были найдены в свободных макрофагах. В 4 группе в макрофагах гранулем располагалось около 85% МБТ. Введение ЛФД ингаляционно также показало себя эффективно в отношении МБТ, располагающихся в свободных макрофагах, в 6 группе в них располагалось только 10% МБТ.

После 6 месяцев введения всех форм изониазида у животных 3,4,5,6 групп наблюдали статистически значимое уменьшение общего количества МБТ. При введении ГИНК общее количество МБТ снизилось в 2 раза по сравнению со 2 группой. При введении декстразида и ЛФД количество МБТ снизилось в 3,9 раза и в 3,3 раза соответственно по сравнению со 2 группой. Объемная плотность общего количества МБТ была меньше на 50% в 4 группе и на 40% в 5 группе по сравнению с группой 3. Статистически значимой разницы между 4 и 5 группой не выявлено. Ингаляционное введение в данном случае показало себя эффективнее

интраперитонеального, уменьшив общее количество МБТ в печени на 40% в 6 группе по сравнению с 5 группой.

При исследовании количества и локализации МБТ в печени экспериментальных животных после 6 месяцев введения форм изониазида, определено, что в микобактерий обнаруживалась внутри свободных макрофагов только в группах, не получавших препараты, у животных 3,4,5,6 групп все найденные МБТ находились в макрофагах гранулем. В 1 и 2 группах в свободных макрофагах располагалось около 10% МБТ.

### *3.2.2. Характеристика морфологических изменений паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

Через три месяца после заражения в ткани печени мышей определяли туберкулёзные гранулёмы, состоящие из макрофагов, фибробластов и эпителиоидных клеток. В основном, гранулёмы располагались перипортально и периваскулярно. В паренхиме встречались ограниченные лимфоидные инфильтраты с единичными нейтрофилами и локусы деструкции, представленные гепатоцитами в состоянии жировой дистрофии и участками некроза. Наиболее выраженными были изменения в группах 1 и 2, не получавшим формы изониазида (Рис.6).

После 2 месяцев введения численная плотность гранулём в 3, 4 и 5 группах по сравнению со второй группой уменьшилась на 40%, 26% и на 33% соответственно (Таблица 9). Статистически значимой разницы в результатах 3, 4 и 5 групп не выявлено. Ингаляционное введение в данном случае показало себя эффективнее интраперитонеального, уменьшив общее количество гранулём в печени на 39% в 6 группе по сравнению с 5 группой.

Средний диаметр гранулём после 2 месяцев введения форм изониазида не отличался от контроля во всех группах.

Объемная плотность гранулём после 2 месяцев введения форм изониазида была меньше во всех группах, получавших препараты. По

сравнению со 2 группой данный показатель был меньше в 2,1, 1,6 и в 1,9 раза соответственно по сравнению с 3, 4 и 5 группой. Статистически значимой разницы между группами, получавшими разные формы изониазида не обнаружено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность гранулём на 34%.

Объемная плотность воспалительных инфильтратов в паренхиме печени после 2 месяцев введения форм изониазида была значительно больше во всех группах по сравнению с 7 группой. Введение форм изониазида статистически значимо уменьшало количество инфильтратов у мышей, но оно оставалось больше, чем в группе отрицательного контроля. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 35%, 18% и на 30% соответственно в группах 3, 4 и 5. Статистически значимых отличий между 3, 4 и 5 группой не было. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимой разницы не показало.

Объемная плотность локусов деструкции в паренхиме печени после 2 месяцев введения форм изониазида была значительно больше во всех группах по сравнению со здоровыми мышами. Статистически значимых отличий между 2 и 3 группой не было. Введение декстразида статистически значимо уменьшало количество инфильтратов, но оно оставалось больше, чем в группе отрицательного контроля. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 27% и на 32% соответственно в группах 4 и 5. По сравнению с 3 группой объем локусов деструкции был меньше на 33% и на 37% по сравнению с группами 4 и 5. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным уменьшило объемную плотность локусов деструкции на 22%.

После 6 месяцев введения численная плотность гранулём в 3, 4 и 5 группах по сравнению со второй группой уменьшилась на 15%, 25% и на 45% соответственно (Таблица 9). Статистически значимой разницы в результатах 3 и 4 групп не выявлено, при использовании ЛФД данный параметр уменьшался

по сравнению с 3 группой на 35%. Ингаляционное введение в данном случае показало себя сравнимо с интраперитонеальным.

Средний диаметр гранулём после 6 месяцев введения форм изониазида в 3, 4 и 5 группах по сравнению со второй группой уменьшился на 14%, 14% и на 35% соответственно (Таблица 9). Статистически значимой разницы в результатах 3 и 4 групп не выявлено, при использовании ЛФД данный параметр уменьшался по сравнению с 3 группой на 24%. Ингаляционное введение в данном случае показало себя сравнимо с интраперитонеальным.

Объемная плотность гранулём после 6 месяцев введения форм изониазида была меньше во всех группах, получавших препараты. По сравнению со 2 группой данный показатель был меньше в 1,5, 1,7 и в 2,5 раза соответственно в сравнении с 3, 4 и 5 группой. Статистически значимой разницы между 3 и 4 группами не обнаружено, при введении ЛФД данный параметр уменьшался на 42% по сравнению с 3 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным показало себя сравнимо с интраперитонеальным.

Объемная плотность воспалительных инфильтратов в паренхиме печени после 6 месяцев введения форм изониазида была больше в группах, не получавших лечение. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 32%, 45% и на 77% соответственно в группах 3, 4 и 5. Статистически значимых отличий между 3 и 4 группой не было, при введении ЛФД данный параметр по сравнению с 3 группой был меньше на 67%. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимой разницы не показало.

Объемная плотность локусов деструкции в паренхиме печени после 6 месяцев введения форм изониазида была значительно больше во всех группах по сравнению со здоровыми мышами, оставаясь максимальным в группах, не получавших лечение. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 1,7, 2,9 и в 5,3 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Статистически значимых отличий между 3 и 4 группой не было, при введении ЛФД данный

параметр по сравнению с 3 группой был меньше на 30%. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимой разницы не показало.

Таблица 9. Результаты исследования **печени** мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно ( $M \pm m$ )

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
NaI гранулём	2 мес	2,86±0,28	2,7±0,34	1,6±0,13*	2±0,11*	1,8±0,35*	1,1±0,12 $\alpha$	-	p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,02 p2-p5<0,002 p5-p6<0,001
	6 мес	1,9±1,1	2±0,9	1,7±0,8*	1,5±0,8*	1,1±0,8*#	1±0,8		p<0,001 p2-p3<0,01 p2-p4<0,02 p2-p5<0,003 p3-p5<0,04
Диаметр гранулём мкм	2 мес	36,8±0,56	37,2±0,76	36,2±0,45	37,5±0,08	35,1±0,49	34,4±0,39	-	
	6 мес	29,4±6,4	28±4,8	24,1±5,3*	24±5,1*	18,2±4,5*#	20,1±6		p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,02 p3-p5<0,001
Vv гранулём, на поле зрения	2 мес	8,9±0,64	8,65±0,45	4,2±0,25*	5,3±0,32*	4,6±0,29*	3,02±0,54 $\alpha$	-	p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,03 p2-p5<0,02 p5-p6<0,01

	<b>6 мес</b>	3,7±2,2	3,8±1,6	2,6±1,2*	2,3±1,6*	1,5±1,1*#	1,3±1,1		p<0,0001
									p2-p3<0,0001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,002 p3-p5<0,001
<b>Vv инфилтратов, на поле зрения</b>	<b>2 мес</b>	5,03±0,2	5,1±0,35	3,3±0,34*	4,17±0,42*	3,56±0,28*	3,32±0,35	0,19±0,03	p<0,0001
									p2-p3<0,0001 p2-p4<0,001 p2-p5<0,02
	<b>6 мес</b>	2,9±0,17	3,1±0,15	2,1±0,14*	1,7±0,2*	0,7±0,15*#β	0,5±0,09		p<0,0001
									p2-p3<0,0001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,01 p3-p5<0,001 p4-p5<0,03
<b>Vv локусов деструкции, на поле зрения</b>	<b>2 мес</b>	17,2±0,36	18,1±0,45	19,7±0,8	13,32±0,27*	12,4±0,52*#	9,65±0,3 α	2,5±0,04	p<0,0001
									p2-p4<0,002 p2-p5<0,01 p3-p5<0,03 p5-p6<0,01
	<b>6 мес</b>	20,7±1,6	21,7±4,2	13,8±0,9*	7,4±0,8*	4,1±0,12*#	3,9±0,3		p<0,0001
									p2-p3<0,01 p2-p4<0,03 p2-p5<0,01 p3-p5<0,02

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно

$N_{ai}$  – численная плотность;  $V_v$  – объёмная плотность;

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

$\beta$  - достоверные различия между 4 и 5 группами;

$\alpha$ - достоверные различия между 5 и 6 группами.

*3.2.3. Состояние соединительной ткани паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

У зараженных БЦЖ экспериментальных животных, как следствие естественного течения инфекционного процесса в паренхиме печени увеличивалось общее количество волокон соединительной ткани. Фибробласты и волокнистая соединительная ткань находились преимущественно вокруг гранулем. Больше всего коллагеновых волокон зафиксировано в группе 3 (Рис.7.) Ретикулярные волокна располагались вокруг и внутри гранулём. Наибольшее количество ретикулярных волокон было обнаружено в группе 3 (Рис.8). Так же исследовали количество коллагеновых и ретикулярных волокон в составе гранулём и в интерстиции (Таблица 10).

После введения форм изониазида в течение 2 месяцев количество коллагеновых волокон увеличилось на 51% и на 17% соответственно в группах 3 и 4 по сравнению с группой, не получавшей препараты. Объемная плотность коллагеновых волокон в гранулёмах была меньше на 40% в 4 группе и на 57% в 5 группе по сравнению с группой 3. Объемная плотность коллагеновых волокон в гранулёмах в 5 группе была без статистически значимых различий с группой, получавшей физраствор. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 2 месяцев введения объемная плотность коллагеновых волокон в интерстиции по сравнению со 2 группой снизилась в 2,4 раза и в 2,9 раза при введении декстразида и ЛФД соответственно, но не изменилась при введении ГИНК. Данный параметр был без статистически значимых различий между 4 и 5 группой. Так же не выявлено разницы между ингаляционным и интраперитонеальным введением. Введение декстразида и ЛФД снизило количество коллагеновых волокон, но оно осталось гораздо больше, чем у здоровых животных.

Таблица 10. Результаты исследования соединительной ткани **печени** мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно ( $M \pm m$ )

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
<b>Vv Коллагеновые волокна в гранулёмах, на поле зрения</b>	<b>2 мес</b>	1,7±0,4	1,9±0,61	3,9±0,9*	2,35±0,75#	1,68±0,48*#	1,61±0,4	-	p<0,001
									p2-p3<0,01 p3-p4<0,001 p2-p5<0,002 p3-p5<0,002
	<b>6 мес</b>	3,8±0,5	3,9±0,47	5,2±0,6	2,9±0,3*#	2,08±0,2*#	2,1±0,6		p<0,001
									p2-p4<0,001 p2-p5<0,003 p3-p4<0,002 p3-p5<0,002
<b>Vv, Коллагеновые волокна в интерстиции, на поле зрения</b>	<b>2 мес</b>	14,2±1,5	13,6±1,9	12,50±1,4	5,67±0,37#*	4,66±0,29*#	4,34±0,35	-	p<0,001
									p2-p4<0,002 p2-p5<0,003 p3-p4<0,004 p3-p5<0,002
	<b>6 мес</b>	8,3±0,9	7,8±1,1	6,2±0,7	2,7±0,2*#	2,1±0,18*#	2,01±0,15		p<0,001
									p2-p4<0,02 p2-p5<0,03 p3-p4<0,03 p3-p5<0,04
<b>% Ретикулярные волокна в</b>	<b>2 мес</b>	2,3±0,3		4,3±0,6*	3,2±0,53#	2,1±0,41 β #	1,98±0,58		p<0,001

гранулёмах, от поля зрения			2,2±0,8						p2-p3<0,02 p3-p4<0,01 p3-p5<0,03
	6 мес	4,7±0,24	4,5±0,38	5,9±0,33	4±0,48#	3,2±0,63*#	2,8±0,65 α		p<0,001 p2-p5<0,0001 p3-p4<0,003 p3-p5<0,002 p5-p6<0,004
% Ретикулярные волокна в интерстиции, от поля зрения	2 мес	7,3±0,34	7±0,62	6,7±0,82	2,8±0,54*#	2,5±0,32*#	2,3±0,18		p<0,001
									p2-p5<0,001 p3-p4<0,001 p3-p5<0,002
	6 мес	3,9±0,64	3,6±0,83	2,2±0,43	1,7±0,41	1,2±0,19*#	1,1±0,15		p<0,001
									p2-p5<0,002 p3-p5<0,003

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

Vv – объёмная плотность;

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами.

Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах после 2 месяцев введения форм изониазида по сравнению со 2 группой повысилось на 43% и на 31% в группах 3 и 4 соответственно. Статистически значимой разницы между 2 и 5 группами не было. По сравнению с 3 группой количество ретикулярных волокон в 4 и 5 группе уменьшилось соответственно на 25% и 51%. Данный параметр был на 34% меньше в 5 группе, по сравнению с 4. Статистически значимой разницы между 5 и 6 группой не было.

Объёмная плотность ретикулярных волокон в паренхиме печени после 2 месяцев введения форм изониазида была больше во всех группах по сравнению со здоровыми мышами, кроме групп, получавших ЛФД. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 2,5 раза, и в 2,8 раза соответственно в группах 4 и 5. Статистически значимых отличий между 2 и 3 группой, а так же между 4 и 5 группой не было. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

После введения форм изониазида в течение 6 месяцев количество коллагеновых волокон в 3 группе увеличилось на 25% по сравнению с группой, не получавшей препараты. В то же время, в группах 4 и 5 количество коллагеновых волокон в гранулёмах снизилось на 25% и на 47% соответственно по сравнению со второй группой. Объемная плотность коллагеновых волокон в гранулёмах была меньше на 44% в 4 группе и на 60% в 5 группе по сравнению с группой 3. Объемная плотность коллагеновых волокон в гранулёмах в 5 группе была без статистически значимых различий с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 6 месяцев введения форм изониазида объемная плотность коллагеновых волокон в интерстиции по сравнению со 2 группой снизилась в 2,8 раза и в 3,7 раза при введении декстразида и ЛФД соответственно, и на 20% при введении ГИНК. Объемная плотность коллагеновых волокон в интерстиции была меньше в 2,3 раза в 4 группе и в 3 раза в 5 группе по сравнению с группой 3. Данный параметр был без статистически значимых различий между 4 и 5

группой. Так же не выявлено разницы между ингаляционным и интраперитонеальным введением.

Объемная плотность ретикулярных волокон в гранулёмах после 6 месяцев введения форм изониазида была больше на 24% группе 3 по сравнению с группой, не получавшей препараты. Статистически значимой разницы между 2 и 4 группами не было. По сравнению с 3 группой количество ретикулярных волокон в гранулёмах в 4 и 5 группе уменьшилось соответственно на 32% и 46%. Статистически значимой разницы между 4 и 5, а также между 5 и 6 группой не было.

Объёмная плотность ретикулярных волокон в паренхиме печени после 6 месяцев введения форм изониазида по сравнению со второй группой был меньше на 40%, 53% и 67%, соответственно чем в группах 3, 4 и 5. Исследование показало, что данный параметр был меньше на 45% в группе 5 по сравнению с 3 группой. Статистически значимых отличий между 3 и 4 группой, а также между 4 и 5 группой не было. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

Для оценки состояния межклеточного матрикса помимо количества ретикулярных и коллагеновых волокон были исследованы уровни ферментов, влияющих на соединительную ткань. Были определены уровни металлопротеиназ 1 и 9 и уровень тканевого ингибитора протеиназы 1 (Таблица 11).

После 2 месяцев введения форм изониазида из всех средств снижение объемной плотности ММР 9 обнаружено только у животных получавших ЛФД, однако уровень ММР 9 остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр в 5 группе был меньше на 20%, на 62% и на 19% соответственно чем в группах 2, 3 и 4. Объемная плотность ММР 9 в 3 группе была больше в 2,1 раза чем в 2 группе и в 2,2 раза больше по сравнению с группой 4. Статистически значимой разницы между 2 и 4 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

После 2 месяцев, введение декстразида и ЛФД показало снижение объемной плотности ММР 1, однако её уровень остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. При введении ГИНК данный параметр по сравнению со 2 группой был больше в 2 раза. Уровень ММР 1 по сравнению со 2 группой был меньше на 14% в группе 4 и на 32% в группе 5. Объемная плотность ММР 1 в 3 группе была больше в 2,3 раза чем в 4 группе и в 3 раза больше по сравнению с группой 5. Показатель был на 21% меньше в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

После 2 месяцев введения всех форм изониазида показало повышение объемной плотности ТМР 1, в группах, получавших ЛФД, данный параметр по сравнению со второй группой был больше на 13% в группе 5. Объемная плотность ТМР 1 в 3 группе была больше на 22%, на 27%, и на 33% по сравнению с 2, 4, и 5 группами соответственно. Статистически значимой разницы между 4 и 5 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

После 6 месяцев введения всех форм изониазида снижение объемной плотности ММР 9 определялось только у животных получавших декстразид и ЛФД, однако уровень ММР 9 остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Статистически значимой разницы между 2, 4 и 5 группой не выявлено. Объемная плотность ММР 9 в 3 группе была больше в 4 раза чем в 2 группе и в 3,4 раза больше по сравнению с группами 4 и 5. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

Таблица 11. Результаты исследования уровня ММР 1, ММР 9, ТИМР 1 в печени мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно (M±m)

Показатель		БЦЖ					Контроль	p-value	
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п			ЛФД инг
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
% ММР 9, на поле зрения	2 мес	5,5±0,24	5,9±0,6	12,5±0,8*	5,8±0,46#	4,7±0,54*# β	4,2±0,36	1,2±0,07	p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p5<0,001 p3-p4<0,02 p3-p5<0,03 p4-p5<0,003
	6 мес	4,1±0,15	4,4±0,7	13,2±0,6*	3,8±0,52*#	3,8±0,32*#	3,2±0,41	–	p<0,001 p2-p3<0,002 p2-p4<0,01 p2-p5<0,003 p3-p4<0,001 p3-p5<0,01
% ММР 1, на поле зрения	2 мес	7,7±0,87	7,2±0,52	14,2±0,8*	6,2±0,23*#	4,9±0,2*# β	4,8±0,31	1,6±0,31	p<0,001 p2-p3<0,02 p2-p4<0,01 p2-p5<0,02 p3-p4<0,01 p3-p5<0,001 p4-p5<0,01
	6 мес	5,2±0,34	4,9±0,81	15,6±0,9*	4,3±0,37#	2,7±0,3*# β	2,5±0,29	–	p<0,001

									p2-p3<0,01 p2-p5<0,002 p3-p4<0,03 p3-p5<0,01 p4-p5<0,03
% ТИМР 1, на поле зрения	2 мес	7,2±0,52	7,1±0,7	5,5±0,35*	7,6±0,62#	8,2±0,31*#	8,6±0,7	13,2±0,8	p<0,001 p2-p3<0,01 p2-p5<0,03 p3-p4<0,02 p3-p5<0,01
	6 мес	6,1±0,44	6,4±0,9	8,6±0,6*	6,2±0,3#	6,4±0,24#	5,8±0,4	–	p<0,001 p2-p3<0,01 p3-p4<0,02 p3-p5<0,03

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами.

После 6 месяцев, при введении декстразида и ЛФД показано снижение объемной плотности ММР 1, однако её уровень остался выше, чем у здоровых мышей. Уровень ММР 1 по сравнению с 3 группой был меньше в 3,2 раз, в 4,6 раз и в 5,8 раз чем в соответственно в 2, 4 и 5 группе. Объемная плотность ММР 1 во 2 группе была больше в 1,8 раза чем в 5 группе и без статистически значимой разницы сравнению с группой 4. Показатель был на 37% меньше в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным статистически значимых отличий не показало.

После 6 месяцев введения всех форм изониазида показано снижение объемной плотности ТМР 1, в группе, получавшей ГИНК, данный параметр был больше на 26% по сравнению со второй группой, больше на 28% чем в группе 4 и больше на 26% чем в группе 5. Статистически значимой разницы между 2, 4 и 5 группой не выявлено. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным разницы не показало.

### *3.2.4. Характеристика процессов воспаления паренхимы печени экспериментальных животных с БЦЖ-гранулематозом после введения различных композиций изониазида.*

Как естественная реакция на заражение и развитие микобактериальной инфекции, в тканях повышался уровень провоспалительных цитокинов. Наибольшая концентрация провоспалительных цитокинов в ткани была в области гранулём и лимфоидных инфильтратов в группах без введения препаратов (Рис.9, Рис.10). Для оценки интенсивности воспаления были исследованы объемные плотности провоспалительных цитокинов - TNF- $\alpha$  и IL-6 на разных сроках различными фармацевтическими средствами (Таблица 12).

Введение всех форм изониазида в течение 2 месяцев показало эффективность в снижении объемной плотности TNF- $\alpha$ , однако уровень TNF- $\alpha$  остался гораздо выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 1,5, 2,4 и в 4 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность TNF- $\alpha$  была меньше на 40% в 4 группе и на 64% в 5 группе

по сравнению с группой 3 и на 40% меньше в 5 группе по сравнению с 4. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным различия не показало.

Изменение уровня IL-6 после двухмесячного введения всех композиций изониазида было сходно с колебаниями уровня TNF- $\alpha$  в группах, получавших формы декстразида, но без статистически значимых отличий между 2 и 3 группой. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше на 36% и на 72% соответственно в группах 4 и 5. Объемная плотность IL-6 была меньше в 1,7 раза в 4 группе и в 3,9 раза в 5 группе по сравнению с группой 3, а так же в 2,3 раза меньше в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным различия не показало.

Введение всех форм изониазида в течение 6 месяцев показало эффективность в снижении объемной плотности TNF- $\alpha$ , однако уровень TNF- $\alpha$  остался выше, чем у здоровых мышей. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 1,4 раза, в 5 раз и в 9,4 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность TNF- $\alpha$  была меньше в 3,4 раза в 4 группе и в 6,9 раз в 5 группе по сравнению с группой 3 и на 47% меньше в 5 группе по сравнению с 4. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным различия не показало.

После шестимесячного введения всех композиций изониазида уровень IL-6 снизился во всех группах, получавших формы изониазида, по сравнению с группой без введения препаратов. Данный параметр по сравнению со второй группой был меньше в 1,4 раза, в 3,2 раза и в 10,5 раза соответственно в группах 3, 4 и 5. Объемная плотность IL-6 была меньше в 2,2 раза в 4 группе и в 7,5 раза в 5 группе по сравнению с группой 3, а так же в 3,4 раза меньше в 5 группе по сравнению с 4 группой. Ингаляционное введение по сравнению с интраперитонеальным различия не показало.

Таблица 12. Результаты исследования уровня TNF- $\alpha$  и IL-6 в **печени** мышей, инфицированных *M. Bovis* после 3х-месячного заражения, на различных сроках (2 и 6 месяцев) воздействия изониазидом, декстразидом и его липосомальной формой, вводимой интраперитонеально или ингаляционно (M $\pm$ m)

Показатель		БЦЖ						Контроль	p-value
		-	NaCl	ГИНК	Декстразид	ЛФД и/п	ЛФД инг		
Группа		1	2	3	4	5	6	7	
% TNF- $\alpha$ , на поле зрения	2 мес	11,2 $\pm$ 1,9	12,6 $\pm$ 1,8	8,7 $\pm$ 0,87*	5,2 $\pm$ 0,23*#	3,1 $\pm$ 0,2*# $\beta$	3,8 $\pm$ 0,31	0,4 $\pm$ 0,02	p<0,001 p2-p3<0,001 p2-p4<0,002 p2-p5<0,002 p3-p4<0,03 p3-p5<0,02 p4-p5<0,03
	6 мес	16,1 $\pm$ 1,1	16,9 $\pm$ 1,3	12,4 $\pm$ 1,3*	3,4 $\pm$ 0,6*#	1,8 $\pm$ 0,11*# $\beta$	2,01 $\pm$ 0,2	-	p<0,001 p2-p3<0,002 p2-p4<0,002 p2-p5<0,03 p3-p4<0,04 p3-p5<0,005 p4-p5<0,01
% IL-6, на поле зрения	2 мес	9,3 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 1,1	10,5 $\pm$ 0,8*	6,2 $\pm$ 0,24*#	2,7 $\pm$ 0,2*# $\beta$	2,5 $\pm$ 0,12	0,2 $\pm$ 0,01	p<0,001 p2-p3<0,01 p2-p4<0,001 p2-p5<0,03 p3-p4<0,003 p3-p5<0,04 p4-p5<0,003

									p<0,001
	<b>6 мес</b>	12,3±0,8	11,6±1,6	8,2±0,35*	3,7±0,4*#	1,1±0,13*# β	1,3±0,15	–	p2-p3<0,002 p2-p4<0,03 p2-p5<0,02 p3-p4<0,004 p3-p5<0,02 p4-p5<0,04

Примечания: БЦЖ – мыши, зараженные МБТ; NaCl - мыши, зараженные МБТ, с введением физраствора в одинаковой дозе и режиме с фармацевтическими композициями; ГИНК – мыши, зараженные МБТ, с введением ГИНК интраперитонеально; Декстразид - мыши, зараженные МБТ, с введением декстразида интраперитонеально; ЛФД и/п - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида интраперитонеально; ЛФД и/г - мыши, зараженные МБТ, с введением липосомальной формы декстразида ингаляционно.

\* – достоверные различия по сравнению с 2 группой,

# - достоверные различия по сравнению с 3 группой;

β - достоверные различия между 4 и 5 группами;

α- достоверные различия между 5 и 6 группами.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Изменения в печени и лёгких при спонтанном течении БЦЖ-гранулематоза.

Исследования патогенетических механизмов развития туберкулёзного процесса являются основой в разработке средств и методов борьбы с заболеванием. В свою очередь, изучение патогенеза туберкулёзной инфекции осуществляется на лабораторных моделях, среди которых удобными являются инбредные лабораторные мыши, инфицированные микобактериями (Cooper A. M., 2015). Моделирование туберкулёза на мышах позволяет изучать динамику процесса с момента инфицирования до развития тяжелых патологических изменений. Генетическая модификация мышей позволяет изучать вклад конкретных типов клеток в защиту от МБТ (Samstein M. et al., 2013; Robinson R. et al., 2010). Человек и мышь имеют сходные показатели основных параметров врожденного и приобретенного иммунитета на микобактерию, включая роль Т-клеток и характер экспрессии провоспалительных цитокинов (Apt A., Kramnik I., 2009; Апт А.С., Кондратьева Т.К., North R. J., 2004). Отмечено сходство реакции В-клеток (Tsai M.C. et al., 2006; Yan B.S. et al., 2006). При подборе экспериментальной модели можно добиться сходного процесса реактивации туберкулёза с образованием казеозного некроза у мышей, как у людей (Hunter R. L. et al., 2007). Прежде чем перейти к клиническим испытаниям, был успешно продемонстрирован терапевтический потенциал некоторых соединений в экспериментах на мышах, (Kerantzas C.A. et al., 2017). Несмотря на ограничения, модель на мышах сыграла важную роль в тестировании и прогнозировании эффективности комбинаций фармацевтических композиций с потенциалом лечения туберкулёза (Gupta A. et al., 2016; Kumar R et al., 2016).

Морфологически туберкулёзное воспаление проявляется формированием гранулём, образованных преимущественно из макрофагов и их производных. После попадания внутрь лёгких микобактерии фагоцитируются макрофагами через рецептор-зависимый эндоцитоз. Попадая внутрь эндосом макрофагов, МБТ препятствует их слиянию с лизосомами и созреванию, из-за чего не происходит

ни элиминации МБТ активным содержимым лизосом, ни запуска апоптоза инфицированной клетки (Russel D.G., 2007). Всё это способствует активному размножению МБТ внутри макрофагов. После накопления в пораженном органе большого количества макрофагов, нагруженных микобактериями, происходит организация клеток в структурную гранулёму. С развитием хронического инфекционного поражения гранулёмы созревают, фиброзируются, отдельные макрофаги развиваются в эпителиоидные клетки и сливаются в гигантские многоядерные клетки Пирогова-Ланганса (Ahmadzadeh K. et al, 2022; Lay G. et al., 2007). При увеличении гранулёмы в размерах клетки, находящиеся в центре, оказываются в гипоксии и погибают, образуя зону казеозного некроза.

Интенсивность течения инфекционного процесса, обусловленного микобактериями, напрямую определяется несколькими факторами, основным из которых является вирулентность возбудителя. Так, использование высоковирулентного возбудителя целесообразно для изучения тяжелого течения (Gil O., 2006), в то время как изучение хронической туберкулёзной инфекции целесообразно осуществлять при использовании низковирулентных микобактерий. Вариантом низковирулентных микобактерий является штамм *M. bovis* БЦЖ, используемый для вакцинации новорожденных (Trunz V. V. et al., 2006). Течение инфекции, вызванной этим штаммом, гораздо менее активное, чем при заражении вирулентным штаммом МБТ, однако при этом присутствуют все основные признаки туберкулёза, вызванного МБТ. В паренхиматозных органах образуются гранулёмы, состоящие из макрофагов и их производных, под действием эндотоксинов микобактерий образуются очаги деструкции в печени и лёгких, повышаются уровни провоспалительных цитокинов (Domingo-Gonzalez R. et al., 2017; Шкурупий В.А., 2007). При длительном течении БЦЖ-гранулематоза так же, как и при туберкулёзе, вызванном вирулентными штаммами, происходит фиброз паренхимы пораженных органов и коллагенизация гранулём (Ким Л.Б. и др., 2020; Шкурупий В.А., 2007). Сравнимо изменяется уровень металлопротеиназ и их ингибиторов. Одним из немногих существенных отличий является отсутствие казеозного некроза в центре гранулём.

Ранее показано, что у мышей через месяц после инфицирования вакциной БЦЖ в лёгких, печени, лимфатических узлах обнаруживались гранулёмы (Шкурупий В.А., 2007). Однако длительных исследований, изучавших хроническое течение БЦЖ-инфекции, ранее не проводилось.

В настоящем эксперименте исследовалась модель хронического БЦЖ-гранулематоза, гранулёмы состояли из макрофагов, единичных эпителиоидных клеток и фибробластов. В легких гранулёмы располагались перибронхиально и рядом с крупными сосудами. В печени большинство гранулём располагались перипортально. При исследовании гранулём после 5 месяцев персистенции инфекции, их параметры и клеточный состав были сходны с данными, полученными в предыдущих исследованиях (Шкурупий В.А., 2007).

К 5 месяцу инфицирования все микобактерии в лёгких уже были захвачены макрофагами, свободных микобактерий не было. В печени после 5 месяцев инфицирования все микобактерии также были внутри макрофагов.

К 9 месяцу персистенции инфекции МБТ в легких были элиминированы во всех группах, и образовавшиеся гранулёмы диссоциировали. Скорее всего, это произошло из-за того, что заражение животных проводилось парентерально, путем введения вакцины БЦЖ в ретроорбитальный синус. При данном способе заражения большинство МБТ попали в печень и были захвачены там макрофагами и другими клетками, способными к фагоцитозу. Объёмная плотность гранулём в печени уменьшилась к 9 месяцу инфицирования достаточно сильно, а их диаметр – незначительно. Возможно, это связано с полным «рассасыванием» мелких (значительно меньше среднего диаметра) гранулём.

После инфицирования разрастание грубой соединительной ткани изолирует инфицированную ткань от здоровой (Warsinske H. C. et al., 2017). В результате этого происходит ремоделирование паренхимы пораженных органов, что особенно сильно нарушает функции лёгких, так как их функционирование напрямую связано со свободным движением (Hunter R.L., 2011; Dheda K. et al., 2005). В настоящем эксперименте показано, что без введения препаратов с увеличением времени персистенции инфекции увеличивалось количество

коллагеновых волокон в гранулёмах и в интерстиции исследуемых органов, что согласуется с ранее полученными результатами для данной модели (Шкурупий В.А., 2007).

Процессы, связанные с рассасыванием и репарацией поврежденных тканей, происходят одновременно с формированием туберкулёзной гранулёмы. Скорость и степень регрессии гранулёмы определяются балансом между медиаторами разрушения ткани и факторами, которые противостоят этим медиаторам или регулируют их (Kubler A. et al., 2015). Большое внимание уделяется активности матриксных металлопротеиназ (ММР) в патогенезе туберкулёза и, в частности, образованию полостей поражения, что является одним из наиболее тяжелых проявлений активного заболевания туберкулёза (Ong C.W. et al., 2014). Уровень исследованных металлопротеиназ и тканевого ингибитора протеиназы изменялся с течением временем введения форм изониазида сходно с изменением количества МБТ и деструктивных изменений. Протеазы разрушают паренхиму органов, в частности коллагеновую составляющую внеклеточного матрикса. Пытаясь уничтожить инфицированные клетки, иммунные реакции, вызванные микобактериальными инфекциями, вызывают разрушение тканей, иногда сопоставимое с токсическим действием МБТ. Повышение уровня протеаз может быть предвестником будущих тяжелых разрушений органов. Некоторые исследования предлагают ингибирование активности ММР для предотвращения разрушения матрикса и снижения заболеваемости и смертности, связанных с туберкулёзом. Внеклеточная активация ММР частично регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП), которые представляют собой эндогенные ингибиторы протеаз, регулирующие функцию ММР. Количественное определение циркулирующих и мокротных ММР было предложено в качестве биомаркеров активного туберкулёза, а полиморфизмы в генах ММР были связаны с восприимчивостью к МБТ (Lee S.H. et al., 2009; Hrabec E, et al., 2002). Между собой уровень протеиназ и их ингибиторов изменялся обратно пропорционально. В данном исследовании уровень ММР в лёгких был наибольшим в группах, не получавших препараты. Возможно, это связано с наибольшим количеством зон

ателектазов и эмфиземы среди всех групп – большая активность протеолитических ферментов приводила к большему разрушению тонких альвеолярных перегородок и образованию безвоздушных зон. В печени наибольшее количество деструктивных изменений было в группе получавшей изониазид, там же наблюдались и самый высокий уровень металлопротеиназ.

Лимфоцитарные инфильтраты и значительная часть клеток, экспрессирующих TNF- $\alpha$  и IL-6, располагались в непосредственной близости от поврежденных зон. Активность воспаления, оцениваемая в объемной плотности инфильтратов и уровне экспрессии провоспалительных цитокинов, в пораженных тканях в целом была связана с объемной плотностью деструктивных изменений, что совпадает с ранее полученными данными (Bruns H. et al., 2009; Dorhoi A., 2014). Как показано ранее, заражение макрофагов *in vitro* стимулирует выделение ряда цитокинов (Russell D. G. et al., 2009; Solovic I. et al., 2010). Продукция этих факторов частично ограничивает рост микобактерий в макрофагах за счёт их аутокринной активации, а также способствует повышению проницаемости сосудов и привлечению в очаг инфекции форменных элементов крови. TNF- $\alpha$  и интерлейкины являются медиаторами процесса активации макрофагов T-клетками инфекции (Algood H. M., 2003). Ранние стадии жизни гранулёмы зависят от продукции TNF- $\alpha$ . Цепь реакций, запущенных TNF- $\alpha$ , позволяет поддерживать локальную структуру гранулёмы и обеспечивает миграцию клеток иммунной системы к очагу (Algood H. M., 2005; Roach D. R., 2002; Saunders V.M. et al., 2007). У мышей, дефицитных по TNF- $\alpha$ , гранулёмы образуются с задержкой, аморфны, а нейтрализация данного цитокина у животных с хронической инфекцией приводит к диссоциации гранулём и реактивации инфекции (Gil O. et al, 2006; Russell D.G. et al., 2009; Domingo-Gonzalez R. et al., 2017). Однако неясно, является ли потеря структуры гранулёмы следствием дефицита специфических цитокинов или дезорганизованные гранулёмы возникают из-за новой волны острого воспаления в ответ на реактивированный бактериальный рост (Chakravarty S.D. et al., 2008).

Таким образом, клеточные реакции, характеризующие длительное течение БЦЖ-гранулематоза без лечения, соответствуют таковым при туберкулёзной инфекции, что позволяет использовать указанную модель для проверки эффективности разрабатываемых композиций изониазида.

#### **4.2. Изменения в печени и лёгких при БЦЖ-гранулематозе у мышей после введения изониазида, побочные эффекты.**

Стандартное лечение туберкулёза включает в себя шестимесячный прием изониазида. Изониазид благодаря своей высокой эффективности остается препаратом выбора для лечения туберкулёза несмотря на то, что он может вызывать печеночную недостаточность (Centers for Disease Prevention, 2010).

К пятому месяцу инфицирования МБТ преимущественно были внутри гранулём. Их количество было максимальным из всех групп, получавших формы изониазида в группе, получавшей ГИНК. Скорее всего, это было связано с тем, что ГИНК плохо проникал в бессосудистую зону, а попадая, имея малую молекулярную массу, не задерживался надолго внутри гранулёмы. Создаваемая такими условиями концентрация изониазида была меньше, чем в группах, получавших различные формы декстразида.

Количество гранулём в печени через два месяца введения форм изониазида в группе, получавшей ГИНК, было таким же, как и в группах, получавшими формы декстразида, но к 6 месяцу введения форм изониазида их количество почти не изменилось, тогда как у других мышей, получавших формы декстразида их количество стало меньше. Небольшие гранулёмы после уничтожения МБТ диссоциировали, но с полным рассасыванием крупных гранулём в этой группе возникли затруднения. Их размер уменьшался, но к 6 месяцу введения форм изониазида оставался больше, чем в группе, получавшей ЛФД. Возможно, это связано с тем, что ГИНК из-за своего небольшого размера может пассивно диффундировать внутрь макрофагов и даже в толщу гранулём, однако, похоже, что его концентрация оказывается недостаточной для эффективного

элиминирования МБТ, персистирующих внутри гранулёмы (Шкурупий В.А., 2007).

В целом, ГИНК хорошо элиминирует МБТ, однако его длительный приём сопровождается наибольшим количеством деструктивных и фибротических изменений. Уровень воспаления был наибольшим среди всех групп, получавших формы изониазида, что связано с неизбирательным токсическим действием ГИНК по сравнению с декстразидом, в котором изониазид связан и высвобождается преимущественно внутри инфицированных МБТ макрофагов. Воспалительные цитокины, в частности TNF- $\alpha$  необходимы для защиты организма от инфекций. Нейтрализация TNF- $\alpha$  у мышей в модели персистирующего туберкулёза с инфекцией низкими дозами *M.tuberculosis* приводила к фатальной реактивации инфекции, демонстрируя роль TNF- $\alpha$  в сдерживании персистирующего туберкулёза (Botha T. et al., 2003; Chakravarty S.D. et al., 2008). Критическая роль TNF в борьбе с МБТ у людей была проиллюстрирована повышенной скоростью реактивации активного туберкулёза у субъектов с латентной формой, получающих терапию моноклональными анти-TNF антителами по поводу ревматоидного артрита или болезни Крона. Наблюдалось более чем пятикратное увеличение заболеваемости ТБ среди пациентов, получающих лечение, при этом у четверти пациентов развилась диссеминированная форма заболевания, а еще у трети – локализованное внелегочное заболевание, что позволяет предположить, что эти случаи преимущественно представляют собой реактивацию ранее контролируемой инфекции *M. tuberculosis* (Harris J., 2010; Keane J. et al., 2001). Однако высокая активность воспаления сопровождалась большим количеством деструктивных изменений. Кроме того, TNF- $\alpha$  может быть фактором, усиливающим гепатотоксичность изониазида. Воспалительные факторы ингибируют экспрессию транспортеров желчных кислот, что приводит к холестазу, а изониазид усиливает это повреждение (Su Y. et al., 2014). Гиперплазируется гладкий эндоплазматический ретикулум для более активного метаболизма токсичных метаболитов, нарастает количество гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии (Иванова Д.А., 2011).

Заметны фибротические осложнения при приёме изониазида. Длительное лечение ГИНК может приводить к фиброзированию печени вплоть до цирроза (Иванова Д.А., 2011; Шмелев Н.А. и др., 1977). В данном эксперименте общее количество коллагеновых волокон в паренхиме и внутри гранулём печени и лёгких было максимальным среди всех групп, включая группу, не получавшую препараты. Скорее всего, это было связано не только с компенсаторными реакциями организма на воспаление и деструкцию тканей, но и с возможным фибротическим побочным эффектом ГИНК.

#### **4.3. Морфофункциональные изменения в печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении Декстразида.**

Ранее было показано, что конъюгат ГИНК с окисленным декстраном – декстразид – не менее эффективнее в сокращении объемной плотности гранулём, чем чистый ГИНК. В настоящем и в предыдущих экспериментах показано, что декстразид сокращает количество коллагеновых волокон в гранулёмах.

Данное исследование показывает, что все использованные средства хорошо проникали в ткани и внутрь отдельных клеток, однако имелись затруднения с проникновением и элиминацией МБТ внутри гранулём. Даже ко второму месяцу введения форм изониазида и в печени, и в лёгких всех мышей, получавших препараты, небольшое число МБТ находилось внутри свободных макрофагов, а к шестому месяцу МБТ остались исключительно внутри макрофагов гранулём. Ранее было показано, как декстразид может преодолевать данное препятствие. Увеличение молекулярной массы изониазида за счёт присоединения окисленного декстрана возможно способствует его накоплению в фагосомах. Кроме того, гибридная молекула увеличивает частоту слияний фагосом с лизосомами, в фаголизосоме получают высокие концентрации бактерицидных веществ (Шкурупий В.А., 2007). Декстразид состоит из окисленного декстрана и изониазида. Основное бактерицидное действие на МБТ оказывается за счёт токсического действия изониазида, однако окисленный декстран вносит свой вклад в элиминацию микобактерий. Ранее было показано, что при инкубировании

макрофагов с декстразидом в них возрастала экспрессия катепсина В (Нещадим Д.В. и др., 2017). Кроме прямого токсического эффекта высокой концентрацией изониазида, бактерицидное влияние имеют активные формы кислорода, продуцируемые окисленным декстраном, как было показано ранее (Ткачев В.О. и др., 2013). Вклад этих форм бактерицидного воздействия меньше, чем непосредственное токсическое действие изониазида, однако это может помочь в преодолении лекарственной устойчивости к изониазиду.

При развитии туберкулёзного гранулематозного воспаления инициируется пролиферативный компонент продуктивного воспаления, связанный с активацией репаративных механизмов – активацией фиброза, с индукцией фибробластов и фиброцитов к пролиферации и накоплением вещества экстрацеллюлярного матрикса, коллагеновых волокон. Процесс «затухания» фиброзирования коррелирует с уменьшением концентрации провоспалительных цитокинов, апоптоза клеток и с преобладанием антифибротических стимулов. В данной работе, у мышей, которым вводили декстразид, значительно снижалось количество коллагеновых и ретикулярных волокон и внутри гранулём, и в паренхиме органов, что было связано с общим уменьшением уровня экспрессии провоспалительных цитокинов и меньшим количеством разрушенных клеток.

При туберкулёзном воспалении происходят значимые структурные перестройки паренхимы пораженных органов. Ранее было показано, что инкубирование макрофагов с декстразидом увеличивает экспрессию металлопротеиназ, ремоделирующих внеклеточный матрикс путем гидролиза коллагенов (Нещадим Д.В. и др., 2016). В настоящем исследовании получены данные, говорящие о снижении уровня экспрессии MMP1 и MMP9 в тканях мышей, получавших формы изониазида.

Известно, что хроническое воспаление индуцирует поражение и последующую гибель паренхиматозных клеток, при этом многие клетки, подвергающиеся апоптозу, активно выделяют цитокины и хемокины, которые активизируют сигнальную трансдукцию гибели клеток, направленную на соседние клетки, и выделяют профибротические воспалительные цитокины, через

активацию toll-like рецепторов, такие как TNF- $\alpha$  и IL-6. Сокращение деструктивных изменений в данном эксперименте привело и к уменьшению уровня экспрессии данных цитокинов. Причём использование всех форм декстразида, в отличие от ГИНК, приводило к гораздо меньшим показателям данных параметров.

#### **4.4. Морфофункциональные изменения в печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом при введении липосомальной формы декстразида. Сравнение разных способов введения.**

Значительные неблагоприятные побочные эффекты и цитотоксичность сильнодействующих препаратов для здоровых тканей требуют разработки новых систем доставки лекарств для улучшения фармакокинетики и селективного распределения нагруженного агента. Внедрение таргетных липосомальных препаратов предоставило потенциальные решения для улучшения доставки лекарств. Основным показателем эффективности новых противотуберкулёзных средств является уменьшение общего количества МБТ при минимальных возможных побочных эффектах. Сильнодействующие соединения для преодоления лекарственной устойчивости и тяжелых случаев заболевания столкнулись с серьезными препятствиями из-за их ограниченной биодоступности, низкой растворимости, низкой эффективности, быстрого клиренса, низкой стабильности, высокой неспецифической токсичности для здоровых органов и увеличения частоты побочных эффектов. Предложенная в данной работе липосомальная форма декстразида показала наилучший эффект, элиминируя МБТ так же эффективно, как и ГИНК, но с гораздо меньшими побочными эффектами. Лекарственные средства, заключенные в липосомы, направленно доставляются в клетки, в частности в макрофаги (Кузякова Л.М., 2005). Липосомы в настоящее время стали наиболее известной системой доставки лекарств на основе наночастиц, одобренной для использования в клинике. Во многом это связано с их простыми методами изготовления, способностью инкапсулировать широкий спектр лекарств и молекул (независимо от гидрофобности, заряда, размера и

других физико-химических свойств) и хорошей биосовместимостью. Все типы липосом заключают в себе водное ядро и, благодаря своей универсальной структуре, способны нести как гидрофобные препараты (в своем фосфолипидном бислое), так и гидрофильные препараты (в своем просвете) (Daraee et al., 2016; Sercombe et al., 2015). Липосомы являются как биосовместимыми, так и биоразлагаемыми (например, при определенных значениях pH и температуры), что можно контролировать путем модификации липидного состава. Кроме того, липосомы поддаются различным модификациям, повышающим их эффективность в качестве носителей для доставки лекарств (Almeida V. et al., 2020). Лекарства или другие небольшие молекулы могут быть включены в гидрофильное ядро или инкапсулированы внутри гидрофобного двойного слоя во время изготовления, или может использоваться комбинация обоих подходов. Для доставки к определенным типам клеток/тканям липосомы можно модифицировать белками или небольшими молекулами для образования целевых биоконъюгатов (Adhikari P. et al., 2017). Изменяя состав при помощи ферментов, света, pH, температуры или ультразвука, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства (Abri Aghdam M. et al., 2019). Концентрация лекарственного средства также становится важным фактором, который может повлиять на скорость высвобождения лекарственного средства и общую эффективность. Биоконъюгация лигандов с липосомами увеличивает специфичность захвата лекарства клетками, уменьшает нецелевые эффекты и часто позволяет вводить более низкие (и меньшие) дозы лекарств (Khan A.A. et al., 2020).

Показано, что при добавлении в культуру макрофагов ЛФД хорошо захватывается фагоцитозом и вызывает более слабые побочные эффекты, чем свободный декстразид. Декстразид может накапливаться внутри гепатоцитов, клеток Купфера и других клеток способных к фагоцитозу, но помещение его в липосомы существенно снижает этот побочный эффект (Архипов С.А. и др., 2015). После высвобождения из липосом внутри фагосомы, помимо бактерицидного действия изониазида, декстразид способствует слиянию фагосом и лизосом, завершению фагоцитоза и развитию цитотоксического действия

лизосомальных ферментов. Лизосомальные катепсины – внутриклеточные белки, гидролизующие белковые структуры микобактерий туберкулёза, поглощенных макрофагами. При развитии инфекционных заболеваний в фагоцитах увеличивается их продукция (Pires D. et al., 2010). Возможно, благодаря «активации» макрофагов окисленным декстраном в макрофагах увеличивается уровень экспрессии катепсинов В и D, что способствует гидролизу белковых структур МБТ, персистирующих внутри (Нещадим Д.В. и др., 2017).

Размеры гранулём определяются величиной хемоаттрактантного потенциала, создаваемого персистируемыми внутри МБТ. На ранних стадиях микобактериальной инфекции при отсутствии установленного адаптивного иммунного ответа гранулёма может фактически усиливать распространение микобактерий путем рекрутирования неинфицированных макрофагов в очаг инфекции, которые затем фагоцитируют инфицированные макрофаги и, таким образом, сами инфицируются. Эти вторично инфицированные макрофаги могут затем покинуть первичную гранулёму и инициировать образование вторичных гранулём как в локальных тканевых участках путем миграции, так и в отдаленных участках путем гематогенного распространения (Davis J.M. et al., 2009). После введения форм изониазида, объёмная плотность гранулём в группах, получавших препараты уменьшилась, по сравнению с мышами, не получавших препараты, а средний диаметр – нет, так что можно сделать вывод, что уменьшение объёмной плотности достигнуто за счёт уничтожения МБТ в небольших гранулёмах и их полной диссоциации. Но применение ЛФД, при сходной эффективности в элиминации МБТ приводило к развитию меньшего количества побочных эффектов по сравнению с использованием ГИНК и декстразида. Объёмная плотность локусов деструкции в печени и зон ателектаза в легких были наименьшими.

Ранее было показано, что добавление к культуре макрофагов ЛФД повышает экспрессию ММР-1 и ММР-9 больше, чем свободный декстразид (Нещадим Д.В. и др., 2016). В группе, получавшей ЛФД, было выявлено минимальное количество коллагеновых и ретикулярных волокон внутри гранулём

и коллагеновых волокон в интерстиции. Ранее было показано, что введение ЛФД снижает выраженность фиброза за счёт фибролизиса и ослабления фиброгенеза (Ким Л. Б. и др. 2020; Ким Л. Б. и др., 2021).

Серьезным ограничением легочной доставки противотуберкулёзных препаратов является плохая растворимость в воде многих лекарственных агентов. Кроме того, тонкость легочного эпителия приводит к короткому пребыванию вдыхаемого лекарственного средства в легких и возможности системных побочных эффектов. Липосомы обладают уникальными свойствами, которые делают их подходящими носителями лекарств. Благодаря повышенной проницаемости и удерживающему эффекту, обусловленному их малым размером, липосомы могут проходить через негерметичные кровеносные сосуды опухоли и накапливаться в раковой ткани, высвобождая инкапсулированное лекарство в целевом месте (Torchilin V., 2010). Легочная система предлагает уникальные возможности для нацеливания из-за большой площади поверхности легких, уклонения от метаболизма при первом прохождении и высокой проницаемости легочного эпителия. В отличие от парентерального введения, ингаляция систем с контролируемым высвобождением может локализовать действие препарата в легких на длительное время; это неинвазивный путь, который может уменьшить системные побочные эффекты. Установлено, что липосомы могут локализовать действие ингаляционных лекарственных средств в легких, улучшая терапевтический эффект медикаментозного лечения и снижая системные побочные эффекты. Многие исследования также показали, что лекарства, заключенные в липосомы, безопасны для доставки в легкие, поскольку липосомы могут контролировать способ высвобождения лекарства, тем самым уменьшая количество лекарства, доступное для оказания побочных эффектов (Clancy J.P. et al. 2013). Чтобы противотуберкулёзная терапия была полезной, концентрация лекарства, достигающая опухоли в легком, должна быть высокой, чтобы вызвать терапевтический эффект. Многие исследования показали, что во время системной химиотерапии концентрация лекарственного средства в паренхиме органов была низкой. Важным преимуществом ингаляционного липосомного препарата

является медленное высвобождение антибиотика, что снижает частоту дозирования и постоянно поддерживает высокие концентрации препарата в легких. Липосомы также могут депонировать лекарство в альвеолярных макрофагах посредством фагоцитоза для улучшения лечения внутриклеточных инфекций, какой является туберкулёз (Bassetti M. et al., 2020). Одной из проблем течения легочного туберкулёза является развитие дисфункции легочного сурфактанта, что приводит к развитию альвеолярного коллапса и дыхательной недостаточности на поздних стадиях туберкулёза легких (Wang Z. et al., 2008). Изониазид в сочетании с липосомами из фосфодиэтилхолина может выступать системой «двойного действия», как замена экзогенному сурфактанту и как ингаляционный носитель противотуберкулёзного препарата при туберкулёзе легких (Chimote G. et al., 2010). Использование липосом позволит химиотерапевтическим агентам достигать ранее спавшихся альвеол благодаря способности сурфактанта распространяться, что может привести к равномерному альвеолярному распределению лекарств.

Ингаляционное введение ЛФД показало себя достаточно эффективным. Легкие имеют большую всасывающую поверхность, чрезвычайно тонкую всасывающую слизистую оболочку и хорошее кровоснабжение. Неинвазивный характер этого пути делает его особенно ценным для доставки лекарств. Применение ЛФД наиболее эффективно по сравнению с другими средствами снижало общее количество микобактерий, объемную плотность гранулём и воспалительных инфильтратов, количество коллагенов и уровень провоспалительных цитокинов. Особенно заметна эффективность ЛФД была при исследовании легких. Практически каждый исследуемый показатель был лучше в данной группе, по сравнению с другими мышами, получавших формы изониазида. Это можно объяснить тем, что при ингаляционном введении локальная концентрация лекарственных средств местно была намного выше, чем при парентеральном введении и легче достигала очагов инфекции. Эффективная элиминация очагов персистенции МБТ приводило к меньшему объему безвоздушных зон в лёгких, меньшему уровню фиброза и воспаления. Для

стерилизации печени применение ЛФД ингаляционно показало себя эффективно в элиминации МБТ. Это можно объяснить захватом липосом альвеолярными макрофагами. Альвеолярные макрофаги образуют первую линию защиты от микроорганизмов, проникающих в легкие через дыхательные пути. Лекарства высвобождаются из липосом после внутрилизосомной деградации. В отличие от интерстициальных макрофагов в легких, альвеолярные макрофаги, расположенные в дисальвеолярном пространстве, имеют прямой доступ к липосомам, вводимым через дыхательные пути, например, путем интратрахеальных инстилляций, интраназального введения или применения аэрозольных липосом (Vyas S. P., 2007).

#### **4.5. Липосомальная форма декстразида как способ преодолеть побочные эффекты противотуберкулезной терапии.**

Печень является основным метаболическим органом в организме. Изониазид метаболизируется и выводится преимущественно в печени, с чем связаны большинство побочных эффектов. Тяжелые побочные эффекты, требующие изменения лечения, возникают у 4-9% пациентов, получающих классическую четырехкомпонентную комбинацию (Gulbay В.Е. et al., 2006). Большинство из них легкие и средней тяжести, их возможно лечить симптоматически, без отмены препаратов. Хотя лекарственное поражение печени (ЛПП), вызванное различными препаратами, несколько отличается, клинические характеристики индуцированного изониазидом поражения печени довольно типичны для ЛПП и включают недомогание, утомляемость, тошноту и рвоту (Маслаускене Т. П., 2005). Продолжительность терапии до проявления желтухи может варьировать от 1 до 25 недель, в среднем 12 недель (Chalasanі N. et al., 2015). При выявлении поражения печени первой линией лечения является отмена препарата и наблюдение за пациентом для восстановления. В большинстве случаев больные выздоравливают. Однако повторная провокация у пациентов с более тяжелым поражением печени может привести к быстрому появлению симптомов (в течение нескольких часов). Тяжелая гепатотоксичность (повышение

уровня трансаминаз более чем в 3–5 раз выше нормы) возникает в 2,4% случаев и может потребовать временного прекращения лечения (Schaberg T. et al., 2017; WHO 2010). Гистологические характеристики тяжелого повреждения печени, вызванного изониазидом, включают гепатоцеллюлярное повреждение с многодольковым некрозом и инфильтратом мононуклеарных клеток, которые обычно неотличимы от вирусного гепатита (Бирон Э.В., 2013). Стеатоз не характерен для поражений печени, вызванных изониазидом. Однако во время лечения активного ТБ, когда изониазид давали в комбинации с другими препаратами, такими как этамбутол, пиразинамид и рифампицин, сообщалось о случаях стеатоза и холестатического поражения печени (Gourishankar A. et al., 2014; Tasduq S.A. et al., 2007). Предполагается, что даже умеренный воспалительный стресс снижает порог возникновения гепатотоксичности, тем самым увеличивая вероятность повреждения печени. Лекарства, обычно считающиеся безопасными, вызывают значительное повреждение печени, когда они связаны с воспалением, вызванным воздействием бактериальных липополисахаридов (Barton et al., 2000).

Помимо прямых токсических реакций, изониазид вызывает идиосинкразические лекарственные поражения печени. Они развиваются у небольшой части пациентов, они не зависят от дозы препарата и их практически невозможно предсказать. Так же сильно разнятся сроки возникновения данного побочного эффекта (Скрыпник И.Н., 2008). Обычно идиосинкразическая реакция возникает через 2-4 недели после начала лечения (Шульпекова Ю.О., 2006). В настоящее время это связывают со специфической трансформацией лекарственных средств из-за генетических особенностей метаболических ферментов (Яковенко Э.П. и др., 2011).

Изониазид представляет собой гидразид изоникотиновой кислоты, который легко окисляется с образованием метаболитов, ответственных за лекарственное поражение печени: ацетилгидразин, гидразин, а также реактивный метаболит, возникающий в результате биоактивации самого изониазида (Stepan A.F. et al., 2011; Metushi I.G. et al., 2011). Эксперименты с участием метаболитов гидразина,

подтверждающие их гепатотоксичность, были проведены несколько десятилетий назад, в которых острое повреждение печени коррелировало с ковалентным связыванием ацетилгидразина и с уровнями гидразина в крови (Metushi I.G. et al., 2011). Было показано, что реактивный метаболит изониазида может реагировать с множественными остатками лизина на печеночных белках (Metushi I.G. et al., 2010; Meng X. et al., 2015). Сообщалось также об автоокислении ИН с участием свободных радикалов (Meng X. et al., 2015). Вклад в гепатотоксичность изониазида может вносить иммунный ответ на лекарственно-модифицированные белки печени. Патогенный аутоиммунный ответ также может объяснить случаи ЛПП, которые продолжают прогрессировать даже после прекращения приема лекарств (Metushi I.G. et al., 2012; Metushi I.G. et al., 2015). Исследования выявили анти-изониазид-антитела и анти-P450 аутоантитела у пациентов с диагнозом ИН-индуцированная печеночная недостаточность (Metushi I.G. et al., 2014). Было высказано предположение, что часть лекарственной гепатотоксичности вызвана повреждением митохондрий (Boelsterli and Lee, 2014; Pessayre et al., 2010). Исследования различных клеточных линий животных *in vitro* показали, что токсичность изониазида возникает в результате индукции апоптоза с сопутствующим нарушением потенциала митохондриальной мембраны и разрывами нитей ДНК (Fatima et al., 2013; Lee and Boelsterli, 2014; Perwitasari et al., 2014; Shaw et al., 2010; Singh et al., 2011). Недавние сообщения предполагают, что изониазид индуцирует окислительный стресс, дисфункцию митохондрий и апоптоз в клетках HepG2 (Bhadauria et al., 2007, 2010; Schwab and Tuschl, 2003). Митохондриальная дисфункция может включать в себя несколько изменений, таких как снижение продукции аденозинтрифосфата, продукции митохондриальных активных форм кислорода и/или рассеивание потенциала митохондриальной мембраны. Было показано, что перекисное окисление эндогенных липидов является фактором цитотоксического действия изониазида (Mahmoud et al., 2014; Pal et al., 2008; Richards et al., 2004; Saad et al., 2010). Изониазид-опосредованное окислительное повреждение обычно связывают с образованием высокоактивных АФК, которые действуют как стимуляторы

перекисного окисления липидов и являются источником разрушения и повреждения клеточной мембраны. Изониазид и его метаболиты действуют как стимуляторы перекисного окисления липидов, что приводит к гибели клеток и некрозу печени (Caro and Cederbaum, 2004). Метаболиты изониазида могут играть роль в индуцированном изониазидом холестазае за счет усиления накопления желчных кислот и  $\beta$ -окисления митохондрий (Cheng J. et al., 2013).

Частота изониазид-индуцированного повреждения печени, по-видимому, выше у пациентов с фенотипом медленных ацетиляторов (Ng C.S. et al., 2014). Скорее всего, это связано с тем, что медленные ацетиляторы имеют более высокие концентрации ацетилгидразина и самого изониазида по сравнению с быстрыми ацетиляторами. Другие известные факторы риска изониазид-индуцированного повреждения печени включают:

- возраст. У пожилых людей снижается скорость выведения продуктов обмена и интенсивность метаболизма (Суханов Д.В. и др., 2012).

- индукция метаболизма CYP с помощью рифапицина (Huang Y.S. et al, 2002; Steele M.A. et al, 1992). Совсем недавно были идентифицированы дополнительные факторы риска индуцированного изониазидом повреждения печени, и они включают полиморфизмы глутатион-S-трансферазы CYP2E1, марганцевой супероксиддисмутазы, UDP-глюкуронозилтрансферазы и другие полиморфизмы в антиоксидантных путях (Leiro V. et al., 2008; Huang Y.S. et al., 2003; Huang Y.S. et al., 2007; Sharma S.K. et al., 2002).

- женский пол. Токсико-аллергические реакции у женщин встречаются чаще (Мордык А.В. и др., 2010).

- способ введения лекарственного препарата. При парентеральном введении повышается уровень ацетилирования препарата, тем самым увеличивается токсическая нагрузка на печень. Интермиттирующее введение может гиперсенсibilизировать организм пациента, из-за чего повысится уровень антител к препарату и аутоиммунные реакции станут тяжелее (Баласанянц Г.С. и др., 2011).

- сочетанное применение различных противотуберкулёзных средств. При одновременном применении гепатотоксичных лекарственных средств повышается риск развития лекарственных поражений печени, вплоть до молниеносного гепатита (Фещенко Ю.И., 2008).

- гипоальбуминемия. В условиях недостаточности белков крови повышается доза несвязанных молекул лекарственных препаратов и усиливается прямое токсическое действие (Мишин В.Ю. и др., 2006).

- длительность лечения противотуберкулёжными препаратами (Иванова Д.А., 2011).

- сопутствующие инфекционные и неинфекционные заболевания. В случае сопутствующей ВИЧ-инфекции токсическое действие на печень усиливается приёмом антиретровирусной терапии.

Гепатотоксичность – самый частый побочный эффект, но с антимикобактериальной терапией связаны достаточно редкие, но серьезные побочные эффекты, такие как невринома зрительного нерва, периферическая невропатия и психоз (Kass J.S. et al., 2010). Продолжительное лечение изониазидом также может привести к волчаночноподобной аутоиммунной реакции с присутствием антинуклеарных антител которая возникает у 20% пациентов (Salazar-Paramo M. et al., 1992, Chalasani N. et al., 2015).

При разработке новых противотуберкулёзных средств необходимо учитывать полученные ранее данные о механизмах токсичности используемых в настоящее время препаратов. Исследуемый в данной работе препарат декстразид показал значимое уменьшение уровня гепатотоксичности при сравнимой эффективности против микобактерий.

## ВЫВОДЫ

1. Морфологическая картина лёгких и печени после девятимесячного инфицирования мышей БЦЖ соответствовала хронической туберкулёзной инфекции: в паренхиме печени обнаружены гранулёмы и персистирующие в них микобактерии, что сопровождалось воспалительными и деструктивными изменениями в тканях.

2. Через 2 месяца после начала введения изониазида и композиций изониазида с окисленным декстраном снизилось общее количество МБТ в лёгких и печени, объемная и численная плотность гранулём; через 6 месяцев – в паренхиме лёгких всех групп мышей МБТ не обнаружили, в печени – отмечено дальнейшее снижение величин показателей, при этом декстразид проявил большую по сравнению с изониазидом эффективность в элиминации микобактерий, персистирующих в печени, и одинаковую – в элиминировании микобактерий, персистирующих внутри отдельных макрофагов и макрофагов гранулём, в лёгких.

3. Декстразид показал меньшую токсичность по сравнению с изониазидом, что проявилось меньшим объемом воспалительных и деструктивных изменений паренхимы лёгких и печени на исследуемых сроках; максимальные отличия были обнаружены после шести месяцев приёма, при этом уровень деструктивных изменений при использовании изониазида был в два раза выше, чем у мышей, получавших декстразид.

4. Уровень фиброзных изменений в лёгких и печени при введении декстразида был ниже, чем у животных, получавших изониазид; к шестому месяцу введения декстразида в два раза снижалась объемная плотность коллагеновых и ретикулярных волокон в гранулёмах и в интерстиции.

5. Липосомальная форма декстразида оказалась более эффективной в уничтожении персистирующих микобактерий и элиминации гранулём; через 6 месяцев после начала ее введения общее количество МБТ в печени уменьшилось в 1,8 и 1,5 раза по сравнению с использованием изониазида и декстразида, что

повлекло за собой уменьшение размера и количества гранулём в печени в 1,5 и 1,4 раза соответственно.

6. Липосомальная форма декстразида оказывала меньшее токсическое действие на лёгкие и печень мышей с БЦЖ-гранулематозом по сравнению с изониазидом и декстразидом; при ее использовании в течение 6 месяцев уровень воспаления в лёгких был в 3 и 2 раза, а в печени – в 7 и 2,5 раза меньше соответственно; количество деструктивных изменений в лёгких и печени при использовании липосомальной формы декстразида было также ниже, в лёгких – в 1,5 и 1,4 раза, а в печени – в 3,5 и 2 раза по сравнению с использованием изониазида и декстразида соответственно.

7. Использование липосомальной формы декстразида привело к уменьшению объема коллагеновых и ретикулярных волокон в структуре гранулём и паренхимы лёгких и печени по сравнению с животными, которым вводили изониазид; через 6 месяцев количество коллагеновых волокон в лёгких было меньше в 2,3 раза, в печени – в 3 раза, а ретикулярных волокон в лёгких в 2 раза, в печени – в 2 раза меньше.

8. Ингаляционное введение липосомальной формы декстразида на 20% эффективнее уничтожало микобактерии, персистирующие в лёгких, чем интраперитонеальное введение, сохраняя при этом сходную эффективность в отношении микобактерий в печени; токсичность препарата при разных способах введения оставалась сходной.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- БЦЖ – бацилла Кальмета-Герена (*Mycobacterium bovis BCG*);
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ГИНК – гидразид изоникотиновой кислоты;
- ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- ИГХ – иммуногистохимия;
- ЛФД – липосомальная форма декстразида;
- МБТ – микобактерия туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis*);
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- МСК – мезенхимальные стволовые клетки
- НАДФ – никотинамид динуклеотид фосфат
- ПАСК – пять-аминосалициловая кислота
- ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость;
- ССL2 – С-С motif ligand 2 (хемоаттрактантный белок моноцитов)
- ССР2 - хемокиновым рецептором 2
- CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки);
- DosR – dormancy survival regulator (регулятор выживания в состоянии покоя)
- ESAT – Early Secreted Antigenic Target (ранняя секретируемая антигенная мишень)
- IL – Interleukin (интерлейкин);
- IFN – Interferon (интерферон);
- LPS – lipopolysaccharide (липополисахариды)
- МНС – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости);
- MMP – Matrix metalloproteinase (матриксная металлопротеиназа);
- Nai – численная плотность;

PDIM – phthiocerol dimycoceroserate (фтиоцерол димикоцеросерат)

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns (молекулярные паттерны, связанные с патогенами);

PtpA – Protein tyrosine phosphatase (протеиновая тирозиновая фосфатаза);

SapM – serum alkaline phosphatase (сывороточная щелочная фосфатаза);

SseA – Stage-Specific Embryonic Antigen (стадиоспецифичный эмбриональный антиген);

SodA – Superoxide Dismutase (супероксиддисмутаза);

STAT – Signal transducer and activator of transcription (преобразователь сигнала и активатор транскрипции);

TIMP1 – Tissue inhibitor metalloproteinase 1 (тканевый ингибитор металломатриксной протеиназы 1);

TLR – toll-like receptor (Толл-подобный рецептор)

TNF- $\alpha$  – Tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

VEGFR – Vascular endothelial growth factor receptor (рецептор эндотелиального фактора роста сосудов)

$V_v$  – объемная плотность

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- [1] Авдиенко К. А., Краснов, В.А., Краснов, Д.В., Грищенко Н.В., Рейхруд М.В., Кононенко В.Г. Морфологическая картина стенки бронхов в месте резекции у больных туберкулезом легких после перибронхиальной лимфотропной или ингаляционной терапии //Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96. – №. 12. – С. 49-54.
- [2] Апт А.С., Кондратьева Т.К. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина //Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42. – №. 5. – С. 880-890.
- [3] Архипов С.А., Шкурупий В.А., Нещади Д.В., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В., Ильин Д.А., Гуляева Е.П. Исследование биосовместимости липосом с противотуберкулезным средством (декстразидом) в культуре макрофагов //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – №. 9-1. – С. 74-78.
- [4] Баласанянц Г.С., Суханов Д.С., Айзиков Д.Л. Побочные действия противотуберкулезных препаратов и методы их устранения: Учебное пособие. СПб., 2011. 88 с.
- [5] Бирон Э.В., Калинина М.В. Лекарственные поражения печени у больных туберкулезом и возможности их коррекции //Фарматека. – 2013. – Т. 4. – С. 84-92.
- [6] Борисов С.Е., Соколова Г.Б. Этиотропное лечение туберкулеза при лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*: взгляды и рекомендации международных организаций // Consilium medicum. – 2001. – Т. 3. – №. 12. – С. 595-602.
- [7] Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 1. Заболеваемость и распространенность туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95. – №. 6.
- [8] Жарков А.С., Шкурупий В.А., Лядов Е.А., Певченко Б.В., Беляев В.Н.,

Троицкий А.В., Куликов В. П. Оценка фармакокинетических параметров и токсичности противотуберкулезного средства на основе окисленного декстрана и гидразида изоникотиновой кислоты. Медицинский альянс – 2013. – №. 4.

[9] Жарков А.С., Шкурупий В.А., Лядов Е.А., Певченко Б.В., Фролов, А.В., Глазев Д. Ю. Оценка результатов доклинического исследования новой противотуберкулезной композиции на основе окисленного декстрана и гидразида изоникотиновой кислоты. Медицинский Альянс, – 2016. – №. 3.

[10] Захарочкина Е. Р. Антибиотики, применяемые при лечении туберкулеза, и их вклад в ЖНВЛП //Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. – 2013. – №. 11. – С. 44-46.

[11] Иванова Д.А. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулёзом: общие вопросы //Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2013. – №. 1. – С. 57-65.

[12] Кашинский И. Русский лечебный травник или описание отечественных врачебных растений/М., 1862.

[13] Ким Л.Б., Путятин А.Н., Русских Г.С., Шкурупий В.А. Особенности ремоделирования внеклеточного матрикса печени и легких мышей с БЦЖ-гранулематозом в периоде хронического воспаления в зависимости от способа введения липосомальной формы декстразида //Туберкулез и болезни легких. – 2021. – Т. 99. – №. 8. – С. 40-46.

[14] Ким Л.Б., Путятин А.Н., Русских Г.С., Шкурупий В.А. Содержание основных компонентов внеклеточного матрикса печени и лёгких мышей при введении липосомальной формы декстразида в периоде хронического БЦЖ-гранулематоза //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170. – №. 10. – С. 462-466.

[15] Кононенко В.Г., Шкурупий В.А. Туберкулез легких-эпидемиологии и парентеральная химиотерапия. – 2002.

[16] Кузякова Л.М. Конструирование трансдермальных липосомальных препаратов с заданными свойствами // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. – 2005. – Т. 46. – № 1. –С. 74-79.

- [17] Лукина А.М. Организация диспансерного наблюдения и лечения социально-дезадаптированных больных туберкулёзом органов дыхания // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – Т. 87. – №. 7. – С. 29-34.
- [18] Маслаускене Т.П., Николаева С.В. Побочное действие противотуберкулезных препаратов //Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2005. – Т. 52. – №. 3. – С. 13-19.
- [19] Матвеевский М.А. Правила лечения гнойной чахотки легких навозными испарениями и другими домашними средствами. СПб., 1849.
- [20] Мишин В.Ю. Фтизиатрия / Учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
- [21] Мишин В.Ю., Чуканов В.И., Григорьев Ю.Г. Побочное действие противотуберкулезных препаратов при стандартных и индивидуализированных режимах химиотерапии. М., 2006. 208 с
- [22] Мордык А.В., Кондря А.В., Гапоненко Г.Е. Частота неблагоприятных побочных реакций на противотуберкулезные препараты у впервые выявленных больных туберкулёзом органов дыхания старше 18 лет и факторы, влияющие на их развитие // Туберкулез и болезни легких 2010. № 2. С. 44–8.
- [23] Морозова Т. Н., Баринбойм О.Н., Докторова Н.П., Данилов А.Н. Опыт использования Хиксозида в терапии туберкулезного поражения бронхов //Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 10. – №. 2. – С. 293-300.
- [24] Нещадим Д. В., Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В. Исследование влияния липосомальной формы декстразида на экспрессию катепсинов в и d макрофагами *in vitro* //Сибирский научный медицинский журнал. – 2017. – Т. 37. – №. 6. – С. 16-21.
- [25] Нещадим Д.В., Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В. Исследование влияния липосом с декстразидом на экспрессию металлопротеиназ MMP-1 и MMP-9 макрофагами *in vitro* //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №. 8-2. – С. 198-202.
- [26] Отс О.Н., Агкацев Т.В., Перельман М.И. Хирургическое лечение туберкулеза легких при устойчивости микобактерий к химиопрепаратам //

Туберкулез и болезни легких. – 2009. – Т. 86. – №. 2. – С. 42-49.

[27] Сайт

ВОЗ

[https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/TB20\\_Exec\\_Sum\\_20201022.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/TB20_Exec_Sum_20201022.pdf)

[28] Сайт Министерства здравоохранения Российской Федерации. (Электронный ресурс) - Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/>(дата обращения 22.02.2020) <https://minzdrav.gov.ru/news/2020/03/24/13577-rossiya-demonstriruet-odin-iz-samyh-znachitelnyh-tempov-snizheniya-zabolevaemosti-i-smertnosti-ot-tuberkuleza-v-mire>

[29] Самойлова А.Г. Эффективность комплексного лечения больных туберкулезом легких с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя и причины ее формирования: Дис. д-р мед. наук. – 2017.

[30] Склярова Е.К., Камалова О.Н., Жаров Л.В. История медицины: краткий курс. – Scientific magazine «Kontser», 2015.

[31] Скрыпник И.Н. Медикаментозные гепатиты: современные аспекты диагностики и лечения // Consilium medicum 2008. Т. 10. № 8. С. 48–52.

[32] Сорокина Т.С. История медицины: учебник для студ. высш, мед, учеб, заведений // М.: Издательский центр «Академия». – 2009.

[33] Супрунчук В. Е., Денисова Е. В. Фукоидан как компонент при разработке таргентных систем доставки лекарственных веществ //Молекулярная медицина. – 2019. – Т. 17. – №. 5. – С. 23-29.

[34] Суханов Д.В., Оковитый С.В. Гепатотропные средства в терапии поражений печени противотуберкулезными препаратами (Учебное пособие). СПб., 2012. 64

[35] Сюнякова Д.А. Особенности эпидемиологии туберкулеза в мире и в России в период 2015-2020 гг. Аналитический обзор. Социальные аспекты здоровья населения [сетевое издание]. 2021. 67 (3):11.

[36] Фещенко Ю.И., Черенько С.А., Мальцев В.И., Викторов А.П., Матвеева Е.В., Логвина И.А. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза // Укр. мед. часопис. 2008. № 5. С. 117–25.

[37] Фисенко В. Противотуберкулезные средства: принципы действия, побочные эффекты и перспективы создания новых лекарственных препаратов //Врач. – 2006. – №. 12. – С. 30-34.

[38] Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П. К. Яблонского. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 240 с

[39] Шкурупий А.В., Троицкий Н.Г., Лузгина Н.Г., Потапова О.В. Фармацевтическая композиция для лечения туберкулеза. Патент РФ № 2372914 // Бюл. № 32. Опубликовано 20.11.2009

[40] Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия / В. А. Шкурупий; Ответственный редактор академик РАМН В.А. Труфакин; Российская академия медицинских наук. – Москва: Издательство РАМН, 2007. – 536 с. – ISBN 978-5-7901-0098-7. – EDN NEDGRV.

[41] Шкурупий В.А., Козяев М.А., Надеев А.П. Ультраструктура эпителиоидных клеток типа А при БЦЖ-гранулематозе и введении лизосомотропной формы изониазида //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141. – №. 4. – С. 474-477.

[42] Шкурупий В.А., Копылов А.Н., Троицкий А.В. Способ получения окисленного декстрана. Патент RU № 2618341 от 09.02.2016.

[43] Шкурупий В.А., Курунов Ю. Н., Гришин О. В., Троицкий А. В., Богданова, Л. А., Курунова, Н. Н., Гуляева, Е. П. Способ получения изониазида пролонгированного действия. – 2002.

[44] Шкурупий В.А., Черданцева Л.А., Ковнер А.В., Троицкий А.В., Быстрова Т.Н., Старостенко А.А. Структурные изменения в печени и лёгких мышей при лечении экспериментального туберкулёза липосомальной формой декстразида //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168. – №. 11. – С. 597-601.7

[45] Шмелев Н.А., Степанян Э.С. Побочное действие противотуберкулезных препаратов. М., 1977. 280 с.

[46] Шульпекова Ю.О. Лекарственные поражения печени //Concilium medicum 2006. Т. 8. № 7. С. 5

[47] Щегерцов Д.Ю., Филинюк О.В., Буйнова Л.Н., Земляная Н.А., Кабанец Н.Н., Аллилуев А. С. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя //Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96. – №. 3. – С. 35-43.

[48] Яковенко Э.П., Яковенко А.В., Иванов А.Н., Обуховский Б.И., Ковтун А.В., Солюянова И.П., Краснолобова Л.П. Лекарственно-индуцированные поражения печени. Диагностика и лечение // Лечащий врач 2011. № 2. С. 16–20.

[49] Abri Aghdam M., Bagheri R., Mosafer J., Baradaran B., Hashemzaei M., Baghbanzadeh A., de la Guardia M., Mokhtarzadeh A. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. *J. Control. Release.* 2019; 315:1–22. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.018.

[50] Adhikari P., Pal P., Das A.K., Ray S., Bhattacharjee A., Mazumder B. Nano lipid-drug conjugate: An integrated review. *Int. J. Pharm.* 2017; 529:629–641. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.039.

[51] Ahmadzadeh K., Vanoppen M., Rose C.D., Matthys P., & Wouters C.H. Multinucleated Giant cells: current insights in phenotype, biological activities, and mechanism of formation //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Т. 10. – С. 724.

[52] Algood H.M., Chan J., Flynn J.L. Chemokines and tuberculosis // *Cytokine Growth Factor Rev.* - 2003. - Vol. 14, № 6. - P. 467-477.

[53] Algood H.M., Lin P.L., Flynn J.L. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis // *Clin. Infect Dis.* - 2005. - Vol. 41, Suppl. 3. - P. S189- S193.

[54] Almeida B., Nag O.K., Rogers K.E., Delehanty J. B. Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 23. – С. 5672.

[55] Apt A., Kramnik I. Man and mouse TB: contradictions and solutions //Tuberculosis (Edinburgh, Scotland). – 2009. – Т. 89. – №. 3. – С. 195.

[56] Arbues A., Lugo-Villarino G., Neyrolles O., Guilhot C., Astarie-Dequeker C. Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell

envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2014. – T. 4. – C. 173.

[57] Bach H., Papavinasasundaram K.G., Wong D., Hmama Z., Av-Gay, Y. Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B //Cell host & microbe. – 2008. – T. 3. – №. 5. – C. 316-322.

[58] Bassetti M., Vena A., Russo A., Peghin M. Inhaled liposomal antimicrobial delivery in lung infections //Drugs. – 2020. – T. 80. – №. 13. – C. 1309-1318.

[59] Berg R. D., Levitte, S., O'Sullivan, M. P., O'Leary, S. M., Cambier, C. J., Cameron, J., Ramakrishnan, L. Lysosomal disorders drive susceptibility to tuberculosis by compromising macrophage migration //Cell. – 2016. – T. 165. – №. 1. – C. 139-152.

[60] Bespyatykh J., Shitikov E., Butenko I., Altukhov I., Alexeev D., Mokrousov I., Dogonadze M., Zhuravlev V., Yablonsky P., Ilina E., Govorun V. Proteome analysis of the Mycobacterium tuberculosis Beijing B0/W148 cluster. Sci Rep 6, 28985 (2016).

[61] Biswas A., Santra S., Bishnu D., Dhali G.K., Chowdhury A., Santra, A. Isoniazid and rifampicin produce hepatic fibrosis through an oxidative stress-dependent mechanism //International Journal of Hepatology. – 2020. – T. 2020.

[62] Blumberg H.M., Burman W.J., Chaisson R.E., Daley, C.L. American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of America: treatment of tuberculosis //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2003. – T. 167. – №. 4. – C. 603.

[63] Botha T., Ryffel B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice //The Journal of Immunology. – 2003. – T. 171. – №. 6. – C. 3110-3118.

[64] Braunstein M., Espinosa B.J., Chan J., Belisle J.T., Jacobs Jr.W. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. Mol Microbiol. 2003; 48(2):453–464.

[65] Bruns H., Meinken C., Schauenberg P., Härter G., Kern P., Modlin R.L., C. Antoni, Stenger S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. J Clin Invest.

2009;119(5):1167–1177. doi: 10.1172/JCI38482

[66] Cambier C.J., Takaki K.K., Larson R.P., Hernandez R.E., Tobin D.M., Urdahl K.B., Christine L.C., Ramakrishnan L. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids //Nature. – 2014. – T. 505. – №. 7482. – C. 218-222

[67] Centers for Disease Prevention. Severe isoniazid-associated liver injuries among persons being treated for latent tuberculosis infection - United States, 2004-2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010; 59: 224-29.

[68] Chakravarty S.D., Zhu G., Tsai M.C., Mohan V.P., Marino S., Kirschner D.E., Huang L., Flynn J., Chan J. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs //Infection and immunity. – 2008. – T. 76. – №. 3. – C. 916-926.

[69] Chalasani N., Bonkovsky H.L., Fontana R., Lee W., Stolz A, Talwalkar J., Reddy K.R., Watkins P.B., Navarro V., Barnhart H., Gu J., Serrano J., United States Drug Induced Liver Injury Network. Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: The DILIN Prospective Study. Gastroenterology 2015;

[70] Chang H.I., Yeh M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy //International journal of nanomedicine. – 2012. – T. 7. – C. 49.

[71] Cheng J., Krausz K.W., Li F., Ma X., Gonzalez, F.J. CYP2E1-dependent elevation of serum cholesterol, triglycerides, and hepatic bile acids by isoniazid //Toxicology and applied pharmacology. – 2013. – T. 266. – №. 2. – C. 245-253.

[72] Chimote G., Banerjee R. In vitro evaluation of inhalable isoniazid-loaded surfactant liposomes as an adjunct therapy in pulmonary tuberculosis //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2010. – T. 94. – №. 1. – C. 1-10.

[73] Chisholm R.H., Trauer, J.M., Curnoe D., Tanaka M.M. Controlled fire use in early humans might have triggered the evolutionary emergence of tuberculosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – T. 113. – №. 32. – C. 9051-9056.

- [74] Cipolla D., Gonda I., Chan H.K. Liposomal formulations for inhalation //Therapeutic delivery. – 2013. – T. 4. – №. 8. – C. 1047-1072.
- [75] Clancy J.P., Dupont L., Konstan M.W., Billings J., Fustik S., Goss C. H., Lymp J., Minic P., Quittner A.L., Rubenstein R.C., Young K.R., Saiman L., Burns J.L., Govan J.R.W., Ramsey B., Gupta R. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with Pseudomonas aeruginosa infection. Thorax. 2013;68:818–825
- [76] Clark M.A., Harvey R.A., Finkel R., Rey J.A., Whalen K. (ed.). Pharmacology. – Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- [77] Clay H., Volkman H.E., Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death //Immunity. – 2008. – T. 29. – №. 2. – C. 283-294
- [78] Colangeli R., Gupta A., Vinhas S.A., Chippada Venkata U.D., Kim S., Grady C., Jones-López E.C., Soteropoulos P., Palaci M., Marques-Rodrigues P., Salgame P., Ellner J.J., Dietze R., Alland D. Mycobacterium tuberculosis progresses through two phases of latent infection in humans. Nat Commun 11, 4870 (2020).
- [79] Conradie F., Diacon A. H., Ngubane N., Howell P., Everitt D., Crook A.M., Mendel C.M, Egizi E., Moreira J., Timm J., McHugh T.D., Wills G.H., Bateson A., Hunt R., Van Niekerk C., Li M., Olugbosi M., Spigelman M. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis //New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 382. – №. 10. – C. 893-902.
- [80] Conte Jr J.E., Golden J.A., McQuitty M., Kipps J., Duncan S., McKenna E., Zurlinden E. Effects of gender, AIDS, and acetylator status on intrapulmonary concentrations of isoniazid //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. – T. 46. – №. 8. – C. 2358-2364.
- [81] Cooper A.M. Mouse model of tuberculosis //Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2015. – T. 5. – №. 2. – C. a018556.
- [82] Cronan M.R. In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses //Frontiers in immunology. – 2022. – T. 13. – C. 820134.

[83] Danelishvili L., Babrak L., Rose S.J., Everman J., Bermudez L.E. Mycobacterium tuberculosis alters the metalloprotease activity of the COP9 signalosome //MBio. – 2014. – T. 5. – №. 4. – C. e01278-14.

[84] Daraee H., Etemadi A., Kouhi M., Alimirzalu S., Akbarzadeh, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 44.1 (2016): 381-391.

[85] Davis J. M., Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection //Cell. – 2009. – T. 136. – №. 1. – C. 37-49.

[86] Davis J.M., Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection //Cell. – 2009. – T. 136. – №. 1. – C. 37-49.

[87] Dey B., Dey R. J., Cheung L.S., Pokkali S., Guo H., Lee J.H., Bishai, W. R. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis //Nature medicine. – 2015. – T. 21. – №. 4. – C. 401-406.

[88] Dheda K., Booth H., Huggett, J.F., Johnson M.A., Zumla A., Rook G. A. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis //The Journal of infectious diseases. – 2005. – T. 192. – №. 7. – C. 1201-1210.

[89] Dheda K., Gumbo T., Maartens G., Dooley K.E., McNerney R., Murray M., Warren R.M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. The lancet Respiratory medicine 5.4 (2017): 291-360.

[90] Dheda K., Lenders L., Magombedze G., Srivastava S., Raj P., Arning E., Ashcraft P., Bottiglieri T., Wainwright H., Pennel T., Linegar A., Moodley L., Pooran A., Pasipanodya J.G, Sirgel F.A., van Helden P.D., Wakeland E., Warren R.M., Gumbo T. Drug-penetration gradients associated with acquired drug resistance in patients with tuberculosis //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2018. – T. 198. – №. 9. – C. 1208-1219.

[91] Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S. A. Cytokines and chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection //Tuberculosis and the tubercle bacillus. – 2017. – C. 33-72.

- [92] Dorhoi A., Kaufmann S.H. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Semin Immunol.* 2014;26(3):203–209. doi: 10.1016
- [93] Elhissi A. Liposomes for pulmonary drug delivery: the role of formulation and inhalation device design // *Current pharmaceutical design.* – 2017. – T. 23. – №. 3. – C. 362-372.
- [94] Elkington P.T., D'Armiento J.M., Friedland J.S. Tuberculosis immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction // *Science translational medicine.* – 2011. – T. 3. – №. 71. – C. 71ps6-71ps6.
- [95] Elkington P.T., Green J.A., Emerson J.E., Lopez-Pascua L.D., Boyle J.J., O'Kane C.M., Friedland J.S. Synergistic up-regulation of epithelial cell matrix metalloproteinase-9 secretion in tuberculosis // *American journal of respiratory cell and molecular biology.* – 2007. – T. 37. – №. 4. – C. 431-437.
- [96] Elkington P.T., Ugarte-Gil C. A., Friedland J. S. Matrix metalloproteinases in tuberculosis. – 2011.
- [97] Ernst J.D. The immunological life cycle of tuberculosis // *Nature Reviews Immunology.* – 2012. – T. 12. – №. 8. – C. 581-591.
- [98] Fallahi-Sichani M., Schaller M.A., Kirschner D.E., Kunkel S.L., Linderman J.J. Identification of key processes that control tumor necrosis factor availability in a tuberculosis granuloma // *PLoS Comput Biol.* – 2010. – T. 6. – №. 5. – C. e1000778.
- [99] Garcia-Contreras L., Sung J.C., Muttill P., Padilla D., Telko M., VerBerkmoes J.L., Elbert K.J., Hickey A.J., Edwards D.A. Dry powder PA-824 aerosols for treatment of tuberculosis in guinea pigs // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 2010. – T. 54. – №. 4. – C. 1436-1442.
- [100] Getahun H., Matteelli A., Chaisson R.E., Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection // *New England Journal of Medicine.* – 2015. – T. 372. – №. 22. – C. 2127-2135.
- [101] Gil O., Guirado E., Gordillo S., Díaz J., Tapia G., Vilaplana C., Ariza A., Ausina V., Cardona P.J. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any

one cytokine or T cell type // *Microbes Infect.* - 2006. - Vol. 8, № 3. - P. 628-636.

[102] Ginhoux F., Schultze J.L., Murray P.J., Ochando J., Biswas S.K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function // *Nature immunology.* – 2016. – T. 17. – №. 1. – C. 34-40.

[103] Global tuberculosis report 2020. (Electronic resource). Geneva: World Health Organization 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (date of access 2021 June 28). Available from: <https://apps.who.int/irLs/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>

[104] Gold M.C., Napier R.J., Lewinsohn D.M. MR 1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* // *Immunological reviews.* – 2015. – T. 264. – №. 1. – C. 154-166.

[105] Goldberg M.F., Saini N.K., Porcelli S.A. Evasion of innate and adaptive immunity by *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbiology spectrum.* – 2014. – T. 2. – №. 5. – C. 2.5. 17.

[106] Gordon S., Martinez F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions // *Immunity.* – 2010. – T. 32. – №. 5. – C. 593-604.

[107] Gourishankar A., Navarro F., DebRoy A.N., Smith K.C. Isoniazid hepatotoxicity with clinical and histopathology correlate // *Annals of Clinical & Laboratory Science.* – 2014. – T. 44. – №. 1. – C. 87-90.

[108] Grobler A., Sierra Z. P., Viljoen H. J. Modeling nanoparticle delivery of TB drugs to granulomas // *Journal of Theoretical Biology.* – 2016. – T. 388. – C. 85-95

[109] Gulbay B.E., Gurkan O.U., Yildiz O.A, Önen Z.P., Erkeköl F.Ö., Baççioğlu A., Acıcan T. Side effects due to primary antituberculosis drugs during the initial phase of therapy in 1149 hospitalized patients for tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100: 1834–42

[110] Guler R., Ozturk M., Sabeel S., Motaung B., Parihar S.P., Thienemann F., Brombacher F. Targeting molecular inflammatory pathways in granuloma as host-directed therapies for tuberculosis // *Frontiers in Immunology.* – 2021. – T. 12. – C. 733853.

[111] Gupta A., Sharma D., Meena J., Pandya S., Sachan M., Kumar S., Singh

K., Mitra K., Sharma S., Panda A.K., Gupta P., Gupta U.D., Misra A. Preparation and preclinical evaluation of inhalable particles containing rapamycin and anti-tuberculosis agents for induction of autophagy //Pharmaceutical research. – 2016. – T. 33. – №. 8. – C. 1899-1912.

[112] Harris J., Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity //Clinical & Experimental Immunology. – 2010. – T. 161. – №. 1. – C. 1-9.

[113] Harris J.E., Nuttall R.K., Elkington P.T., Green J.A., Horncastle D.E., Graebe M.B., Edwards D.R., Friedland J.S. Monocyte-astrocyte networks regulate matrix metalloproteinase gene expression and secretion in central nervous system tuberculosis in vitro and in vivo. J Immunol 2007; 178: 1199–1207

[114] Hershberg R., Lipatov M., Small P.M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., Roach J.C, Kremer K., Petrov D.A., Feldman M.W, Gagneux S. High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography //PLoS Biol. – 2008. – T. 6. – №. 12. – C. e311.

[115] Hinchey J., Lee S., Jeon B.Y., Basarab, R.J., Venkataswamy M.M., Chen B., Braunstein M., Orme I.M., Derrick S.C., Morris S.L., Jacobs W.R., Porcelli S.A. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis //The Journal of clinical investigation. – 2007. – T. 117. – №. 8. – C. 2279-2288.

[116] Hirota K., Hasegawa T., Nakajima T., Inagawa H., Kohchi C., Soma G.I., Makino K., Terada H. Delivery of rifampicin–PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis //Journal of Controlled Release. – 2010. – T. 142. – №. 3. – C. 339-346.

[117] Hmama Z., Peña-Díaz S., Joseph S., Av-Gay Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis //Immunological reviews. – 2015. – T. 264. – №. 1. – C. 220-232.

[118] Hrabec E., Strek M., Zieba M., Kwiatkowsk, S., Hrabec Z. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients //The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2002. – T. 6. –

№. 8. – C. 713-719.

[119] Huang Y.S., Chern H.D., Su W.J., Wu J.C., Chang S.C., Chiang C.H., Chang F.Y., Lee S.D. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2003; 37: 924–30

[120] Huang Y.S., Chern H.D., Su W.J., Wu J.C., Lai S.L., Yang S.Y., Chang F.Y., Lee S.D. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 883–9

[121] Huang Y.S., Su W.J., Huang Y.H., Chen C.Y., Chang F.Y., Lin H.C., Lee S.D. Genetic polymorphisms of manganese superoxide dismutase, NAD(P)Quinone oxidoreductase, glutathione S-transferase M1 and T1, and the susceptibility to drug-induced liver injury. *J Hepatol* 2007; 47: 128–34.

[122] Huang Z., Luo Q., Guo Y., Chen J., Xiong G., Peng Y., Ye J., Li J. Mycobacterium tuberculosis-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 6. – C. e0129744.

[123] Hunter R.L. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review //Tuberculosis. – 2011. – T. 91. – №. 6. – C. 497-509.

[124] Hunter R.L., Jagannath C., Actor J.K. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs //Tuberculosis. – 2007. – T. 87. – №. 4. – C. 267-278.

[125] Jackson M. The mycobacterial cell envelope—lipids //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2014. – T. 4. – №. 10. – C. a021105

[126] Jain N., Kalam H., Singh L., Sharma V., Kedia S., Das P., Ahuja V., Kumar D. Mesenchymal stem cells offer a drug-tolerant and immune-privileged niche to Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun* 11, 3062 (2020).

[127] Jargin S.V. Some aspects of the surgical and endoscopic treatment of tuberculosis in Russia //J Surgery. – 2021. – T. 9. – №. 1. – C. 8.

[128] Justo O.R., Moraes Â.M. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation //Drug delivery. – 2003. – T. 10. – №. 3. – C. 201-207.

[129] Kaneene J.B., Thoen C.O. Tuberculosis // *Vet. Med. Today: Zoonosis Update. JAVMA.* - 2004. - № 5. -P. 685-691.

[130] Kaona F.A., Tuba M., Siziya S., Sikaona L. An assessment of factors contributing to treatment adherence and knowledge of TB transmission among patients on TB treatment. *BMC Public Health* 2004; 4: 68

[131] Kass J.S., Shandera W.X.: Nervous system effects of antituberculosis therapy. *CNS drugs* 2010; 24: 655–67

[132] Keane J., Gershon S., Wise R.P., Mirabile-Levens E., Kasznica J., Schwieterman W.D., Siegel J.N., Braun M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent // *New England Journal of Medicine.* – 2001. – T. 345. – №. 15. – C. 1098-1104.

[133] Kempker R.R., Kipiani M., Mirtskhulava V., Tukvadze N., Magee M.J., Blumberg H.M. Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and poor outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Emerging infectious diseases* 21.6 (2015): 992.

[134] Kerantzas C.A., Jacobs Jr W.R. Origins of combination therapy for tuberculosis: lessons for future antimicrobial development and application // *MBio.* – 2017. – T. 8. – №. 2. – C. e01586-16.

[135] Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis // *Journal of leukocyte biology.* – 2019. – T. 106. – №. 2. – C. 275-282.

[136] Khan A.A., Allemailem K.S., Almatroodi S.A., Almatroudi A., Rahmani A.H. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: An innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech.* 2020; 10:1–15. doi: 10.1007/s13205-020-2144-3.

[137] Khan S., Mandal R.K., Elasmali A.M., Dar S.A., Jawed A., Wahid M., Mahto H., Lohani M., Nath Mishra B., Akhter N., Rabaan A.A., Haque S. Pharmacogenetic association between NAT2 gene polymorphisms and isoniazid induced hepatotoxicity: trial sequence meta-analysis as evidence // *Bioscience reports.* – 2019. – T. 39. – №. 1.

[138] Khuller G. K., Kapur M., Sharma S. Liposome technology for drug delivery against mycobacterial infections //Current Pharmaceutical Design. – 2004. – T. 10. – №. 26. – C. 3263-3274.

[139] Kiran D., Podell B.K., Chambers M., Basaraba R.J. Host-directed therapy targeting the Mycobacterium tuberculosis granuloma: a review //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2016. – T. 38. – №. 2. – C. 167-183.

[140] Kjellsson M. C., Via L.E., Goh A., Weiner D., Low K.M., Kern S., Pillai G., Barry C.E. III, Dartois V. Pharmacokinetic evaluation of the penetration of antituberculosis agents in rabbit pulmonary lesions //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012. – T. 56. – №. 1. – C. 446-457.

[141] Koh W. J., Kwon O.J., Suh G.Y., Chung M.P., Kim H., Lee N.Y., Kim T.S. Lee K. Six-month therapy with aerosolized interferon- $\gamma$  for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis //Journal of Korean Medical Science. – 2004. – T. 19. – №. 2. – C. 167-171.

[142] Kolars J.C., Schmiedlin-Ren P., Schuetz J.D., Fang C., Watkins P.B. Identification of rifampin-inducible P450III<sub>A4</sub> (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. J. Clin. Invest. 1992;

[143] Korb V.C., Chuturgoon A.A., Moodley D. Mycobacterium tuberculosis: manipulator of protective immunity //International journal of molecular sciences. – 2016. – T. 17. – №. 3. – C. 131.

[144] Kubler A., Luna B., Larsson C., Ammerman N.C., Andrade B.B., Orandle M., Bock K.W., Xu Z., Bagci U., Mollura D.J., Marshall J., Burns J., Winglee K., Ahidjo B.A., Cheung L.S., Klunk M., Jain S.K., Kumar N.P., Babu S., Sher A., Friedland J.S., Elkington P.T.G., Bishai W.R. Mycobacterium tuberculosis dysregulates MMP/TIMP balance to drive rapid cavitation and unrestrained bacterial proliferation. J Pathol. 2015;235(3):431–444. doi: 10.1002/path.4432

[145] Kumar A., Toledo J.C., Patel R.P., Lancaster Jr.J.R., Steyn A.J. Mycobacterium tuberculosis DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(28):11568–11573.

[146] Kumar R., Sahu S.K., Kumar M., Jana K., Gupta P., Gupta U.D., Kundu

M., Basu J. MicroRNA 17-5p regulates autophagy in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by targeting mcl-1 and STAT3. *Cell Microbiol.* 2016; 18:679–91.

[147] Kwara A., Flanigan T.P., Carter E.J. Highly active antiretroviral therapy (HAART) in adults with tuberculosis: current status. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9: 248–257.

[148] Lange C. Dheda K., Chesov D., Mandalakas A.M., Udwadia Z., Horsburgh Jr C.R. Management of drug-resistant tuberculosis // *The Lancet.* – 2019. – T. 394. – №. 10202. – C. 953-966.

[149] Lange C., Chesov D., Heyckendorf J., Leung C.C., Udwadia Z., Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: an update on disease burden, diagnosis and treatment // *Respirology.* – 2018. – T. 23. – №. 7. – C. 656-673.

[150] Laohapojanart, N., Ratanajamit, C., Kawkitinarong, K., & Srichana, T. Efficacy and safety of combined isoniazid-rifampicin-pyrazinamide-levofloxacin dry powder inhaler in treatment of pulmonary tuberculosis: A randomized controlled trial // *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* – 2021. – T. 70. – C. 102056.

[151] Lay G., Poquet Y., Salek-Peyron P., Puissegur M.P., Botanch C., Bon H., ... & Altare F. Langhans giant cells from M. tuberculosis-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake // *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland.* – 2007. – T. 211. – №. 1. – C. 76-85.

[152] Lee S.H., Han S.K., Shim Y.S., Yim J.J. Effect of matrix metalloproteinase-9–1562C/T gene polymorphism on manifestations of pulmonary tuberculosis // *Tuberculosis.* – 2009. – T. 89. – №. 1. – C. 68-70.

[153] Lee W.M. Drug-induced hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1118–27.

[154] Lei S., Gu R., Ma X. Clinical perspectives of isoniazid-induced liver injury // *Liver Research.* – 2021. – T. 5. – №. 2. – C. 45-52.

[155] Leiro V., Fernandez-Villar A., Valverde D., Constenla L., Vazquez R., Pineiro L., Gonzalez-Quintela A. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver Int* ISSN 2008; 28: 835–9.

[156] Leistikow R.L., Morton R.A., Bartek I.L., Frimpong I., Wagner K., Voskuil M.I. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy //Journal of bacteriology. – 2010. – T. 192. – №. 6. – C. 1662-1670.

[157] Lenaerts A., Barry III C. E., Dartois V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses //Immunological reviews. – 2015. – T. 264. – №. 1. – C. 288-307.

[158] Li W., Katz B.P., Spinola S.M. Haemophilus ducreyi-induced interleukin-10 promotes a mixed M1 and M2 activation program in human macrophages //Infection and immunity. – 2012. – T. 80. – №. 12. – C. 4426-4434.

[159] Lin P.L., Flynn J.L. The end of the binary era: revisiting the spectrum of tuberculosis //The Journal of Immunology. – 2018. – T. 201. – №. 9. – C. 2541-2548.

[160] Lin P.L., Ford C.B., Coleman M.T., Myers A.J., Gawande R., Ioerger T., Sacchettini J., Fortune S.M., Flynn J.L. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing //Nature medicine. – 2014. – T. 20. – №. 1. – C. 75-79.

[161] Lin P.L., Plessner H.L., Voitenok N.N., Flynn J.L. Tumor necrosis factor and tuberculosis //Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. – Elsevier, 2007. – T. 12. – №. 1. – C. 22-25.

[162] Liu C.H., Liu H., Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion //Cellular & molecular immunology. – 2017. – T. 14. – №. 12. – C. 963-975.

[163] Liu M., Li W., Xiang X., Xie J. Mycobacterium tuberculosis effectors interfering host apoptosis signaling //Apoptosis. – 2015. – T. 20. – №. 7. – C. 883-891.

[164] Lopez-Varela E., Abulfathi A.A., Strydom N., Goussard P., van Wyk A.C., Demers A.M., Deventer A.V., Garcia-Prats A.J., van der Merwe J., Zimmerman M., Hesselning A. Drug concentration at the site of disease in children with pulmonary tuberculosis //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2022. – T. 77. – №. 6. – C. 1710-1719.

[165] Madansein R., Parida S., Padayatchi N., Singh N., Master I., Naidu K.,

Zumlaf A., Maeurer M. Surgical treatment of complications of pulmonary tuberculosis, including drug-resistant tuberculosis //International Journal of Infectious Diseases. – 2015. – T. 32. – C. 61-67.

[166] Marakalala M.J., Raju R. M., Sharma K., Zhang Y.J., Eugenin E.A., Prideaux B., Daudelin I.S., Chen P.Y. Booty M.G., Kim J J.H., Eum S.Y., Via L.E., Behar S.M., Barry III C.E., Mann M., Dartois V., Rubin E.J. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized //Nature medicine. – 2016. – T. 22. – №. 5. – C. 531-538

[167] Marino S., Cilfone N.A., Mattila J.T., Linderman J.J., Flynn J.L., Linderman J., Kirschner D.E. Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection //Infection and immunity. – 2015. – T. 83. – №. 1. – C. 324-338.

[168] Martin C.J., Carey A.F., Fortune S.M. A bug's life in the granuloma //Seminars in immunopathology. – Springer Berlin Heidelberg, 2016. – T. 38. – №. 2. – C. 213-220.

[169] Matsuura E., Umehara F., Hashiguchi T., Fujimoto N., Okada Y., Osame M. Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis. J Neurol Sci 2000; 173: 45–52.

[170] Mattila J.T., Ojo O.O., Kepka-Lenhart D., Marino S., Kim J.H., Eum S.Y., Via L.E., Barry III C.E., Klein E., Kirschner D.E., Morris Jr. S.M., Lin P.L., Flynn, J.L. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms //The Journal of Immunology. – 2013. – T. 191. – №. 2. – C. 773-784.

[171] Meers P., Neville M., Malinin V., Scotto A.W., Sardaryan G., Kurumunda R., Mackinson C., James G., Fisher S., Perkins W.R. Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic Pseudomonas aeruginosa lung infections //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – T. 61. – №. 4. – C. 859-868.

[172] Mehrotra P., Jamwal S.V., Saquib N., Sinha N., Siddiqui Z., Manivel V., Chatterjee S., Rao K.V. Pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis is expressed by

regulating metabolic thresholds of the host macrophage //PLOS pathogens. – 2014. – Т. 10. – №. 7. – С. e1004265.

[173] Meng X., Maggs J.L., Usui T., Whitaker P., Ns F., Dj N., Bk P. Auto-oxidation of Isoniazid Leads to Isonicotinic-Lysine Adducts on Human Serum Albumin. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 51–8.

[174] Metchnikoff E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. – Рипол Классик, 1893.

[175] Metushi I.G., Cai P., Zhu X., Nakagawa T., Uetrecht J.P. A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 911–4

[176] Metushi I.G., Hayes M.A., Uetrecht J. Treatment of PD-1 mice with amodiaquine and anti-CTLA4 leads to liver injury similar to idiosyncratic liver injury in patients. *Hepatology* 2015; 61: 1332–42.

[177] Metushi I.G., Nakagawa T., Uetrecht J. Direct oxidation and covalent binding of isoniazid to rodent liver and human hepatic microsomes: humans are more like mice than rats. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 2567–76

[178] Metushi I.G., Sanders C., Lee W.M., Uetrecht J. Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology* 2014; 59: 1084–93

[179] Mirzayev F., Viney K., Linh N.N., Gonzalez-Angulo L., Gegia M., Jaramillo E., Zignol M., Kasaeva T. World Health Organization recommendations on the treatment of drug-resistant tuberculosis, 2020 update //European Respiratory Journal. – 2021. – Т. 57. – №. 6.

[180] Molle V., Girard-Blanc C., Kremer L., Doublet P., Cozzone A.J., Prost J.F. Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis* //Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – Т. 308. – №. 4. – С. 820-825.

[181] Montes-Worboys A. et al. Targeted delivery of amikacin into granuloma //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2010. – Т. 182. – №. 12. – С. 1546-1553.

- [182] Mossalam M., Dixon A.S., Lim C.S. Controlling subcellular delivery to optimize therapeutic effect //Therapeutic delivery. – 2010. – T. 1. – №. 1. – C. 169-193.
- [183] Mosser D.M. The many faces of macrophage activation //Journal of leukocyte biology. – 2003. – T. 73. – №. 2. – C. 209-212.
- [184] Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., Naghavi M. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis //The Lancet. – 2022. – T. 399. – №. 10325. – C. 629-655.
- [185] Muttil P., Kaur J., Kumar K., Yadav A.B., Sharma R., Misra A., Nambi S. The oxidative stress network of Mycobacterium tuberculosis reveals coordination between radical detoxification systems. Cell Host Microbe. 2015; 17(6):829–837.
- [186] Ng C.S, Hasnat A., Al Maruf A., Ahmed M.U., Pirmohamed M., Day C.P., Aithal G.P., Daly A.K. N-acetyltransferase 2 (NAT2) genotype as a risk factor for development of drug-induced liver injury relating to antituberculosis drug treatment in a mixed-ethnicity patient group. Eur J Clin Pharmacol 2014; 70: 1079–86.
- [187] North R.J. Immunity to tuberculosis / R. J. North, Y. J. Jung // Annual Review of Immunology. – 2004. – Vol. 22. – P. 599-623. – DOI 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104635.
- [188] Oehlers S.H., Cronan M.R., Scott N.R., Thomas M.I., Okuda K.S., Walton E.M., Beerman R.W., Crosier P.S., Tobin D.M. Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth. Nature. 2015; 517(7536):612–615
- [189] Ong C.W., Elkington P.T., Friedland J.S. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. Am J Respir Crit Care Med. 2014;190(1):9–18. doi: 10.1164/rccm.201311-2106PP
- [190] Pagán A. J., Ramakrishnan L. Immunity and immunopathology in the tuberculous granuloma //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2015. – T. 5. – №. 9. – C. a018499.
- [191] Pagán A.J., Ramakrishnan L. The formation and function of granulomas //Annual review of immunology. – 2018. – T. 36. – C. 639-665.
- [192] Paige C., Bishai W. R. Penitentiary or penthouse condo: the tuberculous granuloma from the microbe's point of view //Cellular microbiology. – 2010. – T. 12. –

№. 3. – C. 301-309

[193] Pandey R., Khuller G.K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – T. 55. – №. 4. – C. 430-435.

[194] Pandey R., Khuller G.K. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis //Tuberculosis. – 2005. – T. 85. – №. 4. – C. 227-234.

[195] Parkin D.P., Vandenplas S., Botha F.J., Vandenplas M.L., Seifart H.I., Van Helden P.D., van der Walt B.J., Donald P.R., Van Jaarsveld P.P. Trimodality of isoniazid elimination: phenotype and genotype in patients with tuberculosis. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1997

[196] Pasipanodya, Jotam G., Shashikant Srivastava, and Tawanda Gumbo. "Meta-analysis of clinical studies supports the pharmacokinetic variability hypothesis for acquired drug resistance and failure of antituberculosis therapy." Clinical Infectious Diseases 55.2 (2012): 169-177.

[197] Philips J.A., Ernst J.D. Tuberculosis pathogenesis and immunity //Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2012. – T. 7. – C. 353-384

[198] Pires D., Bettencourt P., Carmo N., Anes E. Role of Mycobacterium tuberculosis outer-membrane porins in bacterial survival within macrophages // Drug Discov. Today. 2010. 15

[199] Poirier V., Bach H., Av-Gay Y. Mycobacterium tuberculosis promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 $\alpha$  //Journal of Biological Chemistry. – 2014. – T. 289. – №. 42. – C. 29376-29385.

[200] Prabakaran D., Singh P., Jaganathan K.S., Vyas S.P. Osmotically regulated asymmetric capsular systems for simultaneous sustained delivery of anti-tubercular drugs //Journal of controlled release. – 2004. – T. 95. – №. 2. – C. 239-248.

[201] Pradipta I.S., Forsman L.D., Bruchfeld J., Hak E., Alffenaar J.W. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. Journal of Infection 77.6 (2018): 469-478.

[202] Price N.M., Gilman R.H., Uddin J., Recavarren S., Friedland J.S. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 2003; 171: 5579–5586.

[203] Prideaux B., Via L.E., Zimmerman M.D., Eum S., Sarathy J., O'brien P., Chen C., Kaya F., Weiner D.M., Chen P.Y., Song T., Lee M., Shim T.S., Cho J.S., Kim W., Cho S.N., Olivier K.N., Barry III C.E., Dartois V. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat Med.* 2015

[204] Puri R.V., Reddy P.V., Tyagi A.K. Secreted acid phosphatase (SapM) of *Mycobacterium tuberculosis* is indispensable for arresting phagosomal maturation and growth of the pathogen in guinea pig tissues // *PloS one.* – 2013. – T. 8. – №. 7. – C. e70514.

[205] Radtke K.K., Dooley K.E., Dodd P.J., Garcia-Prats A.J., McKenna L., Hesselning A.C., Savic R.M. Alternative dosing guidelines to improve outcomes in childhood tuberculosis: a mathematical modelling study // *The Lancet Child & Adolescent Health.* – 2019. – T. 3. – №. 9. – C. 636-645.

[206] Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis // *Nature Reviews Immunology.* – 2012. – T. 12. – №. 5. – C. 352-366.

[207] Riaz M.K., Zhang X., Wong K.H., Chen H., Liu Q., Chen X., Zhang G., Lu A., Yang Z. Pulmonary delivery of transferrin receptors targeting peptide surface-functionalized liposomes augments the chemotherapeutic effect of quercetin in lung cancer therapy // *International journal of nanomedicine.* – 2019. – T. 14. – C. 2879.

[208] Rijnders B.J., Cornelissen J.J., Slobbe L., Becker M.J., Doorduijn J.K., Hop W.C., Ruijgrok E.J., Lüwenberg B., Vulto A., Lugtenburg P.J., de Marie S. Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial // *Clinical infectious diseases.* – 2008. – T. 46. – №. 9. – C. 1401-1408.

[209] Roach D.R., Bean A.G., Demangel C., France M.P., Briscoe H., Britton W.J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection // *J. Immunol.* - 2002. - Vol. 168,

№ 9. - P. 4620-4627.

[210] Robinson R., Khader S., Martino C., Fountain J., Teixeira-Coelho M., Pearl J., Smiley S., Winslow G., Woodland D., Walter M.J., Conejo-Garcia J.R., Gubler U., Cooper A.M. 2010. Mycobacterium tuberculosis infection induces il12rb1 splicing to generate a novel IL-12R $\beta$ 1 isoform that enhances DC migration. *J Exp Med* 207: 591–605.

[211] Roca F.J., Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species // *Cell*. – 2013. – T. 153. – №. 3. – C. 521-534.

[212] Rose S.J., Neville M.E., Gupta R., Bermudez L.E. Delivery of aerosolized liposomal amikacin as a novel approach for the treatment of nontuberculous mycobacteria in an experimental model of pulmonary infection // *PLoS One*. – 2014. – T. 9. – №. 9. – C. e108703.

[213] Roy R.B., Whittaker E., Seddon J.A., Kampmann B. Tuberculosis susceptibility and protection in children // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2019. – T. 19. – №. 3. – C. e96-e108.

[214] Russel D.G., New ways to arrest phagosome maturation // *Nat. Cell. Biol.* - 2007. - Vol. 9, № 4. - P. 357-359.

[215] Russell D.G., Cardona P.J., Kim M.J., Allain S., Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma // *Nature immunology*. – 2009. – T. 10. – №. 9. – C. 943-948.

[216] Sacks L.V., Pendle S., Orlovic D., Andre M., Popara M., Moore G., Thonell L., Hurwitz S. Adjunctive salvage therapy with inhaled aminoglycosides for patients with persistent smear-positive pulmonary tuberculosis // *Clinical infectious diseases*. – 2001. – T. 32. – №. 1. – C. 44-49.

[217] Sakai S., Mayer-Barber K.D., Barber D.L. Defining features of protective CD4 T cell responses to Mycobacterium tuberculosis // *Current opinion in immunology*. – 2014. – T. 29. – C. 137-142.

[218] Salazar-Paramo M., Rubin R.L., Garcia-De La Torre I. Systemic lupus erythematosus induced by isoniazid. *Ann Rheum Dis* 1992;

- [219] Salem I.I., Flasher D.L., Düzgüneş N. Liposome-encapsulated antibiotics //Methods in enzymology. – Academic Press, 2005. – T. 391. – C. 261-291.
- [220] Samstein M., Schreiber H.A., Leiner I.M., Sušac B., Glickman M.S., Pamer E.G. Essential yet limited role for CCR2+ inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming //Elife. – 2013. – T. 2. – C. e01086.
- [221] Saraav I., Singh S., Sharma S. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion? //Immunology and cell biology. – 2014. – T. 92. – №. 9. – C. 741-746.
- [222] Saunders B.M., Britton W.J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis // Immunol. Cell. Biol. - 2007. - Vol. 85, № 2. - P. 103-111. EDN: MLAYWP
- [223] Schaberg T., Bauer T., Brinkmann F., Diel R., Feiterna-Sperling C., Haas W., Hartmann P., Hauer B., Heyckendorf J., Lange C., Nienhaus A., Otto-Knapp R., Priwitzer M., Richter E., Rumetshofer R., Schenkel K., Schoch O.D., Schönfeld N., Stahlmann R. Tuberculosis guideline for adults-guideline for diagnosis and treatment of tuberculosis including LTBI testing and treatment of the German central committee (DZK) and the German respiratory society (DGP) //Pneumologie (Stuttgart, Germany). – 2017. – T. 71. – №. 6. – C. 325-397.
- [224] Schreier H., Gonzalez-Rothi R.J., Stecenko A.A. Pulmonary delivery of liposomes. Journal of Controlled Release 24.1-3 (1993): 209-223
- [225] Scordo J.M., Knoell D.L., Torrelles J.B. Alveolar epithelial cells in Mycobacterium tuberculosis infection: active players or innocent bystanders? //Journal of innate immunity. – 2016. – T. 8. – №. 1. – C. 3-14.
- [226] Seaworth B.J., Griffith D.E. Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis //Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. – 2017. – C. 129-158.
- [227] Sendide K., Deghmane A.E., Reyrat J.M., Talal A., Hmama Z. Mycobacterium bovis BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface //Infection and immunity. – 2004. – T. 72. – №. 7. – C. 4200-4209.

[228] Sercombe L., Veerati T., Moheimani F., Wu S.Y., Sood A.K., Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery //Frontiers in pharmacology. – 2015. – T. 6. – C. 286.

[229] Seung K.J., Becerra M.C., Atwood S.S., Alcántara F., Bonilla C.A., Mitnic C.D. Salvage therapy for multidrug-resistant tuberculosis //Clinical Microbiology and Infection. – 2014. – T. 20. – №. 5. – C. 441-446.

[230] Seung K.J., Keshavjee S., Rich M.L. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2015. – T. 5. – №. 9. – C. a017863.

[231] Sharma S.K., Balamurugan A., Saha P.K., Pandey R.M., Mehra N.K. Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. Am J Respir Crit Care Med 2002;

[232] Skrahina A., Hurevich H., Zalutskaya A., Sahalchyk E., Astrauko A., van Gemert W., Hoffner S., Rusovich V., Zignol M. Alarming levels of drug-resistant tuberculosis in Belarus: results of a survey in Minsk //European Respiratory Journal. – 2012. – T. 39. – №. 6. – C. 1425-1431.

[233] Sohen S.B., Gern B.H., Delahaye J.L., Adams K.N., Plumlee C.R., Winkler J.K., Sherman D.R., Gerner M.Y., Urdahl K.B. Alveolar macrophages provide an early Mycobacterium tuberculosis niche and initiate dissemination //Cell host & microbe. – 2018. – T. 24. – №. 3. – C. 439-446. e4.

[234] Solovic I., Sester M., Gomez-Reino J.J., Rieder H.L., Ehlers S., Milburn H.J., Kampmann B., Hellmich B., Groves R., Schreiber S., Wallis R.S., Sotgiu G., Schölvink E.H., Goletti D., Zellweger J.P., Diel R., Carmona L., Bartalesi F., Ravn P., Bossink A., Duarte R., Erkens C., Clark J., Migliori G.B., Lange C. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. – 2010.

[235] Stanley L.A., Sim E. Update on the pharmacogenetics of NATs: structural considerations. – 2008.

[236] Steele M.A., Burk R.F., DesPrez R.M. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis. Chest 1991; 99: 465–71.

[237] Stepan A.F., Walker D.P., Bauman J., Price D.A., Baillie T.A., Kalgutkar A.S., Aleo M.D. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1345–410.

[238] Su Y., Zhang Y., Chen M., Jiang Z., Sun L., Wang T., Zhang, L. Lipopolysaccharide exposure augments isoniazide-induced liver injury // *Journal of Applied Toxicology*. – 2014. – T. 34. – №. 12. – C. 1436-1442.

[239] Sundararajan S., Babu S., Das S.D. Comparison of localized versus systemic levels of Matrix metalloproteinases (MMPs), its tissue inhibitors (TIMPs) and cytokines in tuberculous and non-tuberculous pleuritis patients // *Human immunology*. – 2012. – T. 73. – №. 10. – C. 985-991.

[240] Sundararajan S., Muniyan R. Latent tuberculosis: interaction of virulence factors in *Mycobacterium tuberculosis* // *Molecular Biology Reports*. – 2021. – T. 48. – №. 8. – C. 6181-6196.

[241] Tadokera R., Meintjes G.A., Wilkinson K.A., Skolimowska K.H., Walker N., Friedland J.S., Maartens G., Elkington P.T.G., Wilkinson R.J. Matrix metalloproteinases and tissue damage in HIV-tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome // *European journal of immunology*. – 2014. – T. 44. – №. 1. – C. 127-136.

[242] Tasduq S.A., Kaiser P., Sharma S.C., Johri, R.K. Potentiation of isoniazid-induced liver toxicity by rifampicin in a combinational therapy of antitubercular drugs (rifampicin, isoniazid and pyrazinamide) in Wistar rats: A toxicity profile study // *Hepatology Research*. – 2007. – T. 37. – №. 10. – C. 845-853.

[243] Taylor J.L., Hattle J.M., Dreitz S.A., Troudt J.M., Izzo L.S., Basaraba R., Orme I.M., Matrisian L.M., Izzo A.A. Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Infection and immunity*. – 2006. – T. 74. – №. 11. – C. 6135-6144.

[244] Timmins G. S., Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid // *Molecular microbiology*. – 2006. – T. 62. – №. 5. – C. 1220-1227.

[245] Torchilin V. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. In: Schäfer-Korting M, editor. Drug Delivery. Vol. 197. Berlin: Springer; 2010. pp. 3–53

[246] Tostmann A., Boeree M.J., Aarnoutse R.E., De Lange W.C., Van Der Ven A. J., Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review //Journal of gastroenterology and hepatology. – 2008. – T. 23. – №. 2. – C. 192-202.

[247] Trunz B.B., Fine P.E. M., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness //The Lancet. – 2006. – T. 367. – №. 9517. – C. 1173-1180.

[248] Tsai M.C., Chakravarty S., Zhu G., Xu J., Tanaka K., Koch C., Tufariello J., Flynn J., Chan J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. Cell Microbiol 2006; 8:218–32.

[249] Turner P.V., Brabb T., Pekow C., Vasbinder M.A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., 50 (2011), pp. 600-613

[250] Tweed C.D., Dawson R., Burger D.A., Conradie A., Crook A.M., Mendel C.M., Conradie F., Diacon A.H., Ntinginya N.E., Daniel E Everitt, Haraka F., Mengchun Li M, van Niekerk C.H., Okwera A., Rassool M.S., Reither K., Sebe M.A., Staples S., Variava E., Spigelman M. Bedaquiline, moxifloxacin, pretomanid, and pyrazinamide during the first 8 weeks of treatment of patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis: a multicentre, open-label, partially randomised, phase 2b trial //The Lancet Respiratory Medicine. – 2019. – T. 7. – №. 12. – C. 1048-1058.

[251] Unissa A.N., Subbian S., Hanna L.E., Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis //Infection, Genetics and Evolution. – 2016. – T. 45. – C. 474-492.

[252] Valiulin S.V., Onischuk A.A., Baklanov A.M., Dubtsov S.N., Dultseva

G.G., An'kov S.V., ...& Schwartz Y.S. Studies of the Specific Activity of Aerosolized Isoniazid against Tuberculosis in a Mouse Model //Antibiotics. – 2022. – T. 11. – №. 11. – C. 1527.

[253] van der Wel N., Hava D., Houben D., Fluitsma D., van Zon M., Pierson J., Brenner M., Peters P.J. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells //Cell. – 2007. – T. 129. – №. 7. – C. 1287-1298.

[254] Vergne I., Chua J., Lee H.H., Lucas M., Belisle J., Deretic V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – T. 102. – №. 11. – C. 4033-4038.

[255] Volkman H.E., Pozos T.C., Zheng J., Davis J.M., Rawls J.F., Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium //Science. – 2010. – T. 327. – №. 5964. – C. 466-469.

[256] Vyas S.P., Khatri K. Liposome-based drug delivery to alveolar macrophages //Expert opinion on drug delivery. – 2007. – T. 4. – №. 2. – C. 95-99.

[257] Walzl G., McNerney R., du Plessis N., Bates M., McHugh T.D., Chegou N.N., Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers //The Lancet Infectious Diseases. – 2018. – T. 18. – №. 7. – C. e199-e210.

[258] Wang P.Y., Xie S.Y., Hao Q., Zhang C., Jiang B.F. NAT2 polymorphisms and susceptibility to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a meta-analysis //The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2012. – T. 16. – №. 5. – C. 589-595.

[259] Wang Z., Schwab U., Rhoades E, Chess P., Russell D., Notter R. Peripheral cell wall lipids of Mycobacterium tuberculosis are inhibitory to surfactant function. Tuberculosis 2008; 88:175–186.

[260] Warsinske H.C., DiFazio R.M., Linderman J.J., Flynn J.L., Kirschner D.E. Identifying mechanisms driving formation of granuloma-associated fibrosis during

*Mycobacterium tuberculosis* infection //Journal of theoretical biology. – 2017. – T. 429. – C. 1-17.

[261] Wayne L.G., Hayes L.G. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence //Infection and immunity. – 1996. – T. 64. – №. 6. – C. 2062-2069.

[262] Wells C.D., Cegielski J.P., Nelson L.J., Laserson K.F., Holtz T.H., Finlay A., Castro K., Weyer K. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis—the perfect storm //The Journal of infectious diseases. – 2007. – T. 196. – №. Supplement\_1. – C. S86-S107.

[263] Wen X., Wang J.S., Neuvonen P.J., Backman J.T. Isoniazid is a mechanism-based inhibitor of cytochrome P450 1A2, 2A6, 2C19 and 3A4 isoforms in human liver microsomes. Eur. J. Clin. Pharmacol. 2002; 57: 799– 804.

[264] WHO: Treatment of tuberculosis: guidelines—4th edition. World Health Organization Press 2010.  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44165/9789241547833\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44165/9789241547833_eng.pdf) (last accessed on 1 September 2019)

[265] Winau F., Winau F., Weber S., Sad S., De Diego J., Hoops S.L., Breiden B., Sandhoff K., Brinkmann V., Kaufmann S.H.E., Schaible U.E. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis //Immunity. – 2006. – T. 24. – №. 1. – C. 105-117.

[266] Winston C. A., Mitruka K. Treatment duration for patients with drug-resistant tuberculosis, United States //Emerging infectious diseases. – 2012. – T. 18. – №. 7. – C. 1201.

[267] Wood G.C., Swanson J.M. Aerosolised antibacterials for the prevention and treatment of hospital-acquired pneumonia //Drugs. – 2007. – T. 67. – №. 6. – C. 903-914.

[268] Yan B.S., Kirby A., Shebzukhov Y.V., Daly M.J., Kramnik I. Genetic architecture of tuberculosis resistance in a mouse model of infection. Genes Immun 2006; 7:201–10.

[269] Zhao Y., Xu S., Wang L., Chin D.P., Wang S., Jiang G., Xia H., Zhou Y.,

Li Q., Ou X., Pang Y., Song Y., Zhao B., Zhang H., He G., Guo J., Wang Y. National survey of drug-resistant tuberculosis in China //New England Journal of Medicine. – 2012. – T. 366. – №. 23. – C. 2161-2170.

[270] Zhou H., Zhang Y., Biggs D.L., Manning M.C., Randolph T.W., Christians U., Hybertson B.K., Ng K.Y. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages //Journal of controlled release. – 2005. – T. 107. – №. 2. – C. 288-299.

[271] Zhu X.W., Price N.M., Gilman R.H., Recarvarren S., Friedland J.S. Multinucleate giant cells release functionally unopposed matrix metalloproteinase-9 in vitro and in vivo. J Infect Dis 2007; 196: 1076–1079

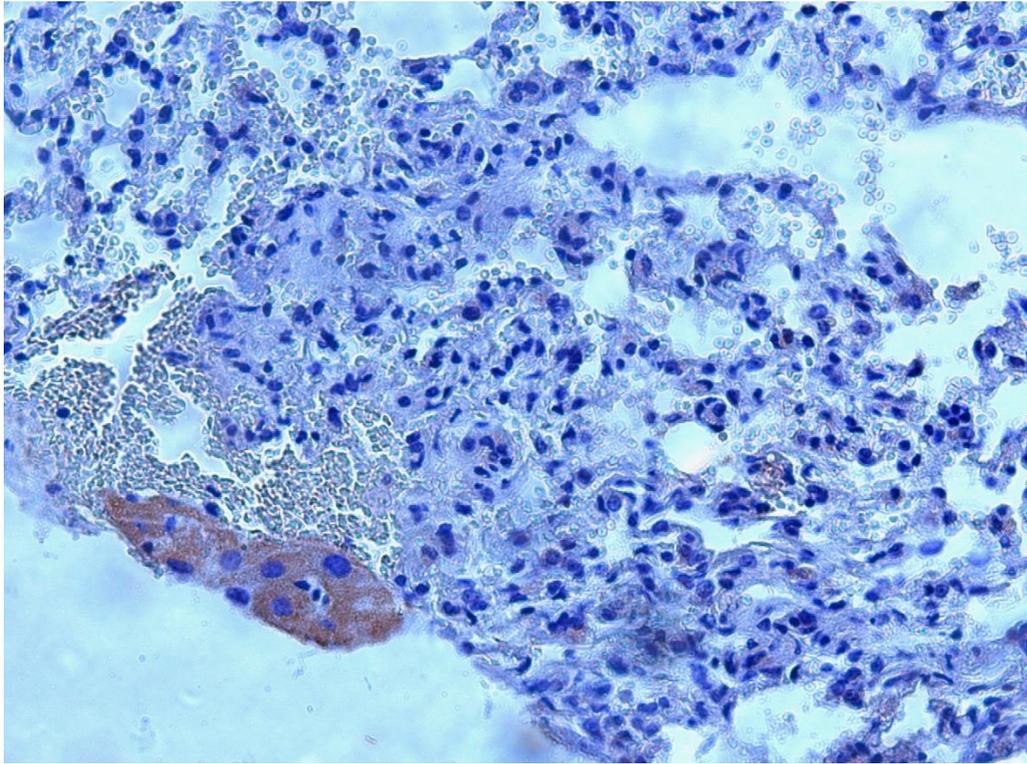
**ПРИЛОЖЕНИЯ**

Рис.1. Увеличение x200. Лёгкие, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на МБТ. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения)

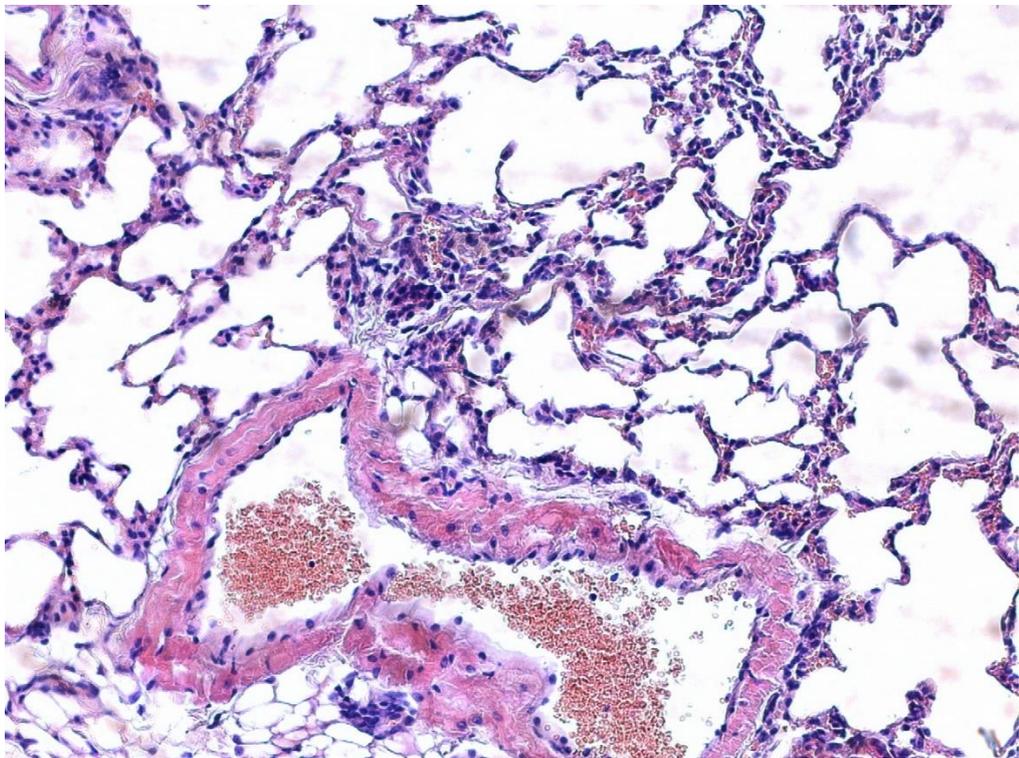


Рис.2. Увеличение x200. Лёгкие, 2 мес. лечения. Окраска гематоксилином и эозином. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

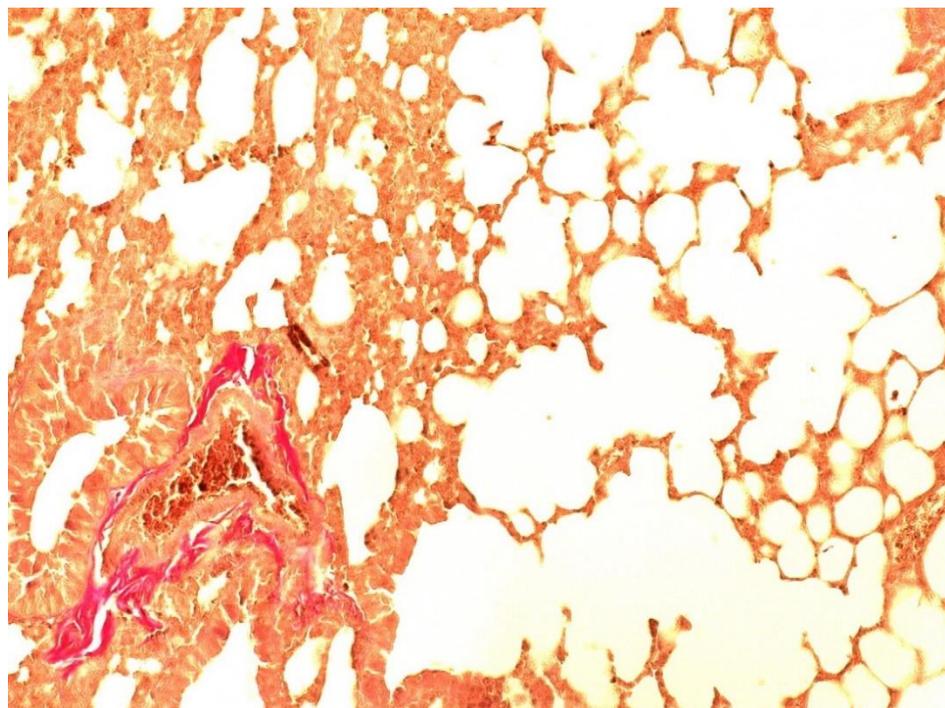


Рис.3. Увеличение x200. Легкие, 2 мес. лечения. Окраска по Ван-Гизон. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

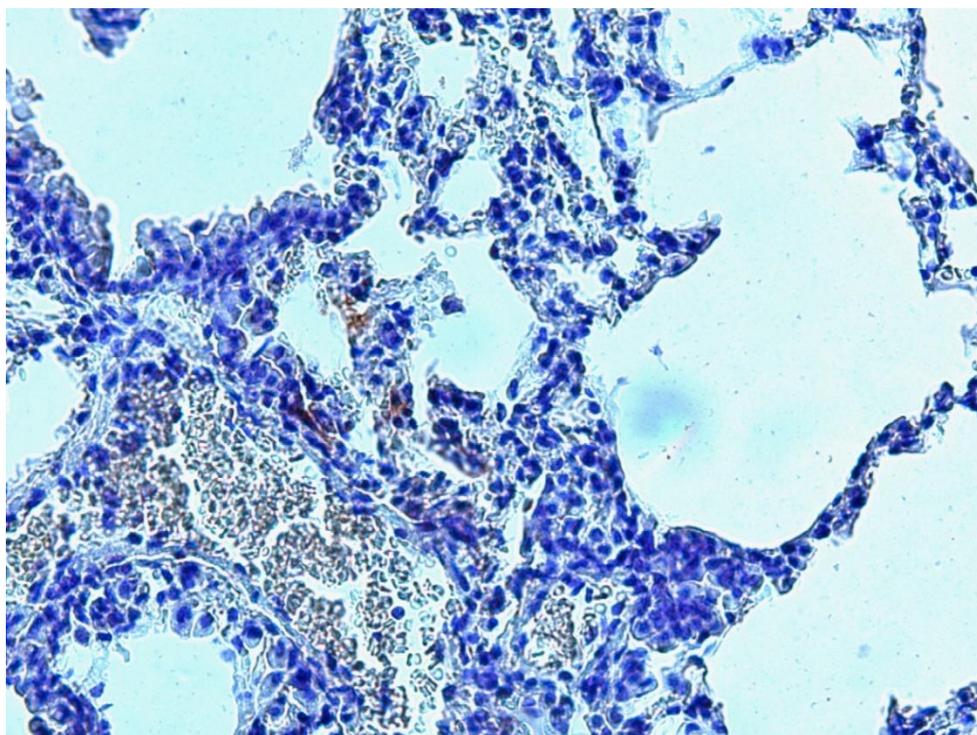


Рис.4 Увеличение x200. Лёгкие, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на TNF-α. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения)

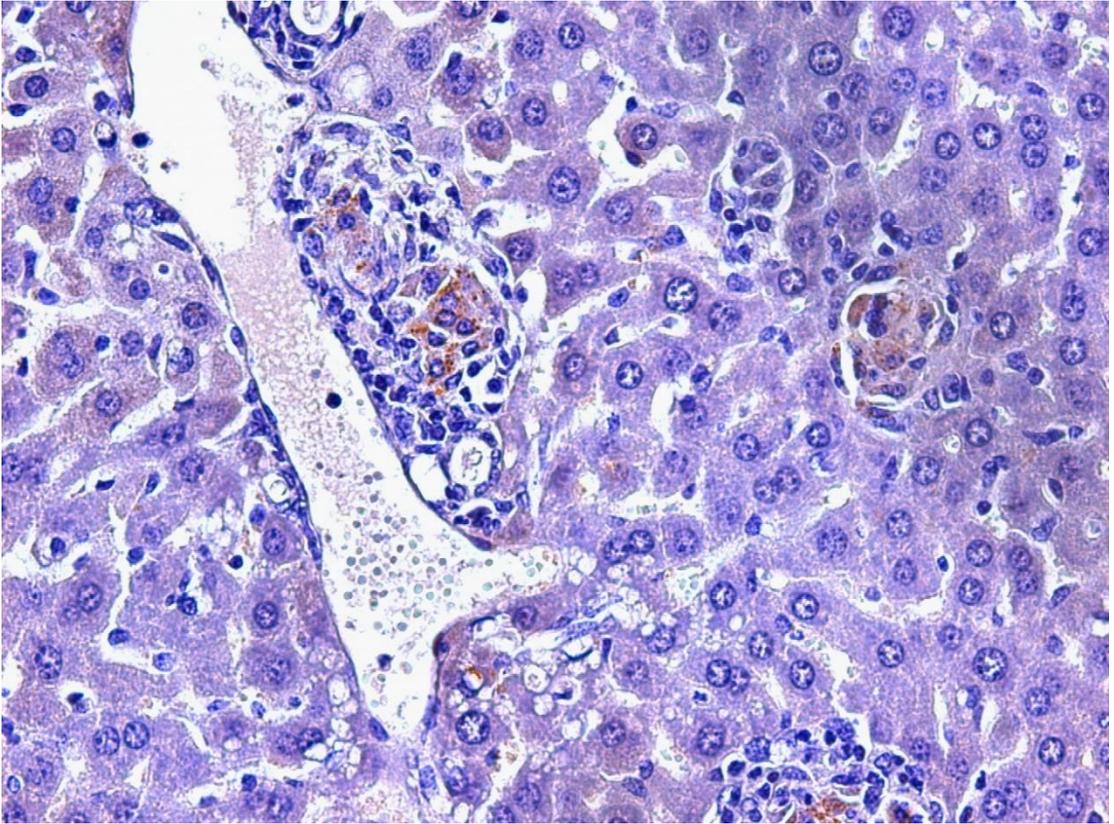


Рис.5. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на МБТ. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

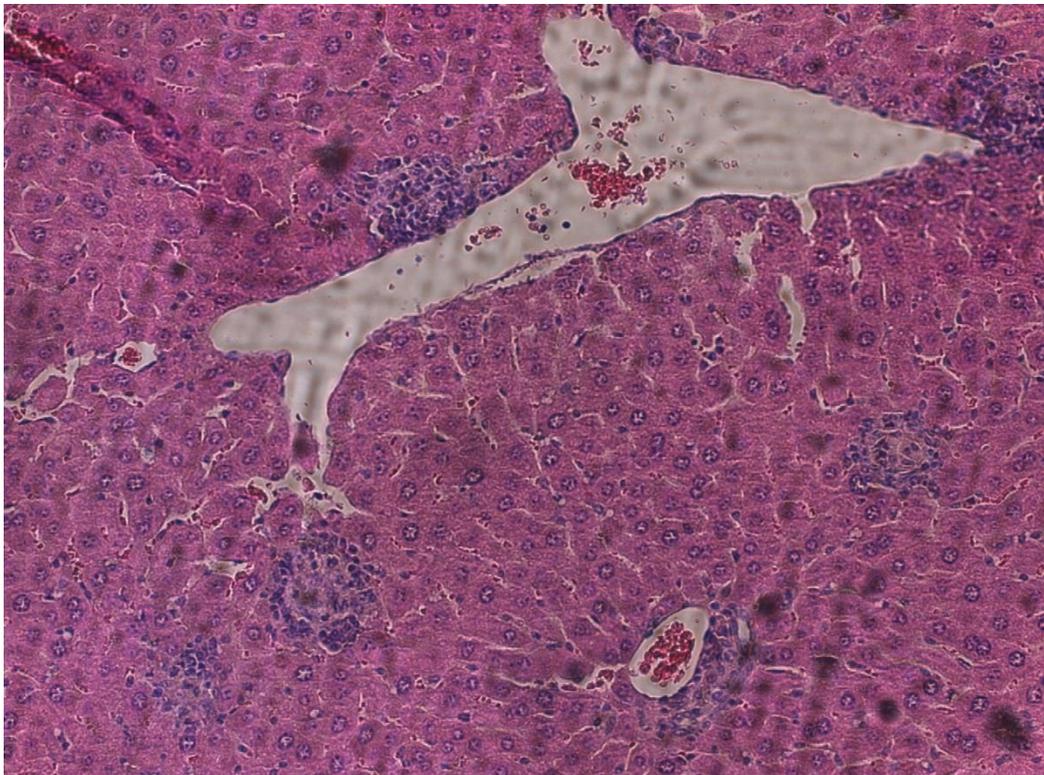


Рис.6. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Окраска гематоксилин-эозин. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

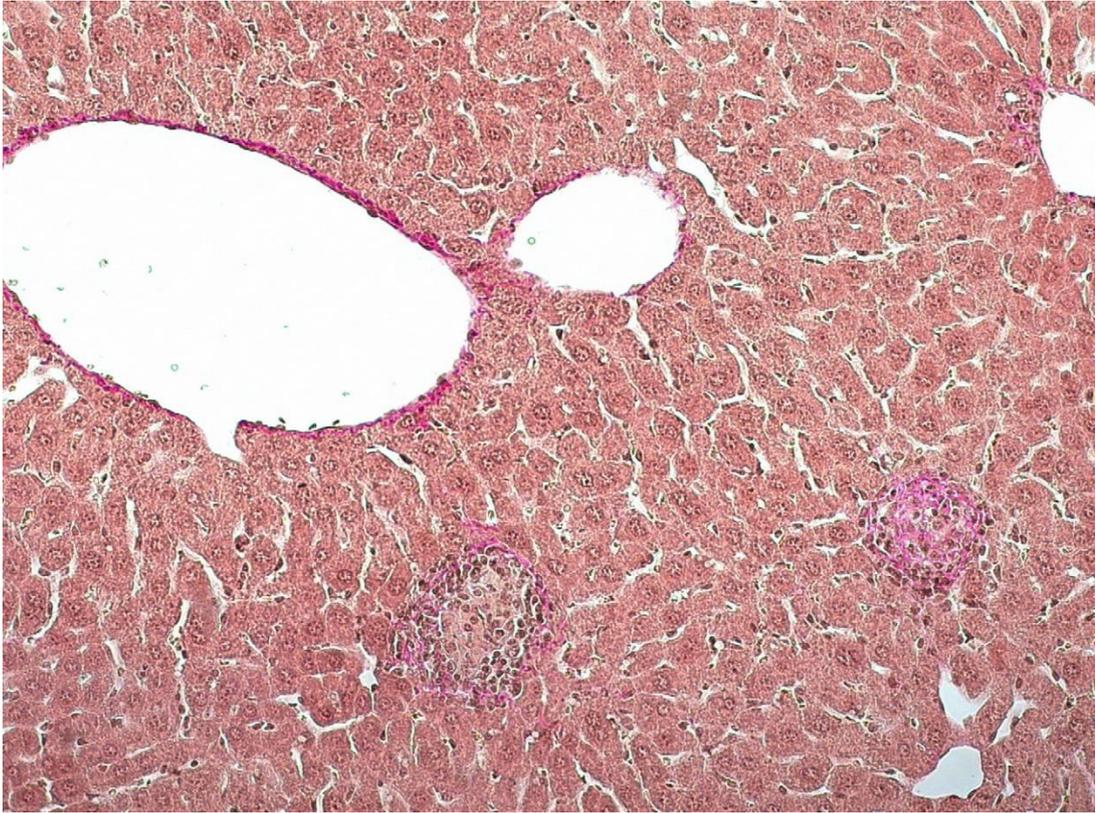


Рис.7. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Окраска по Ван-Гизон. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

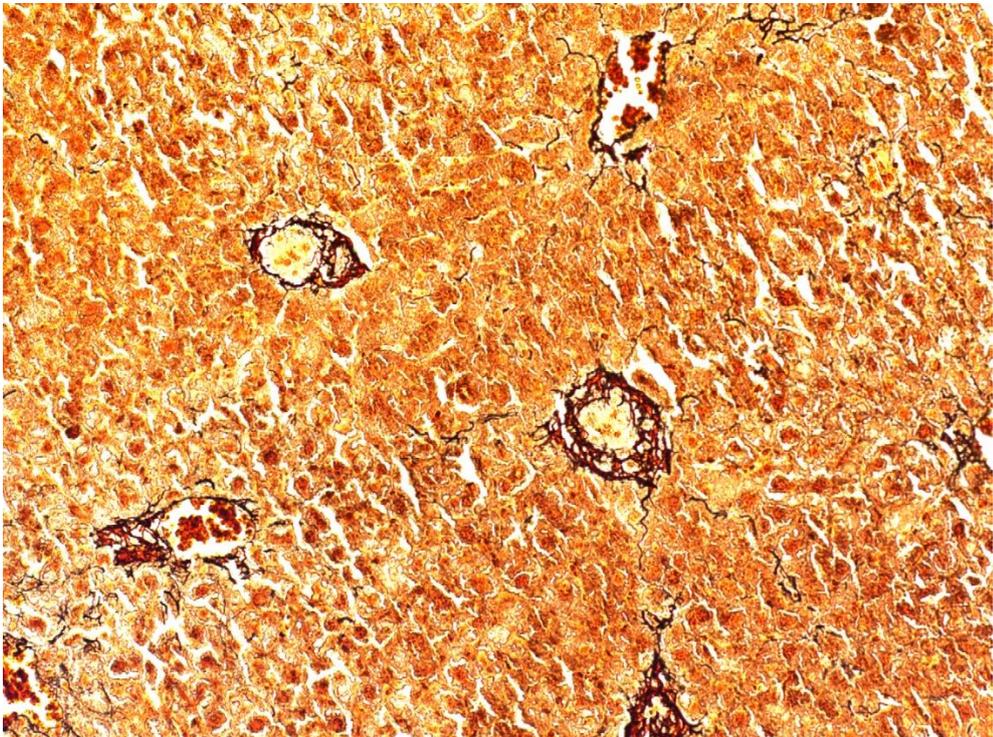


Рис.8. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Импрегнация серебром. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения).

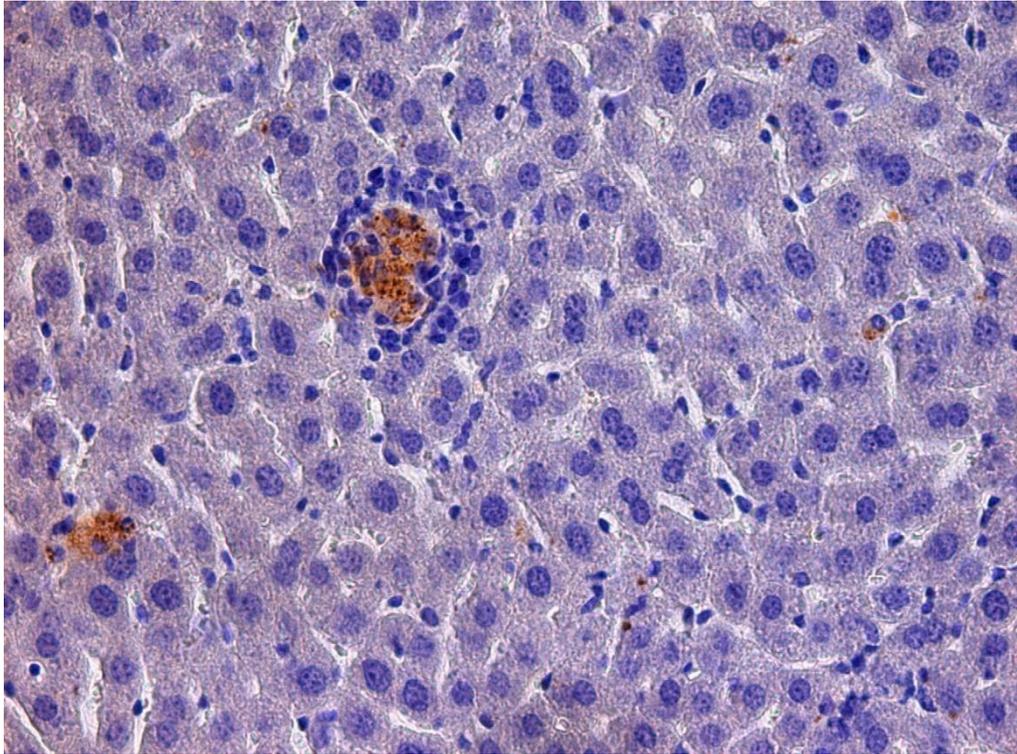


Рис.9. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на TNF- $\alpha$ . 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения)

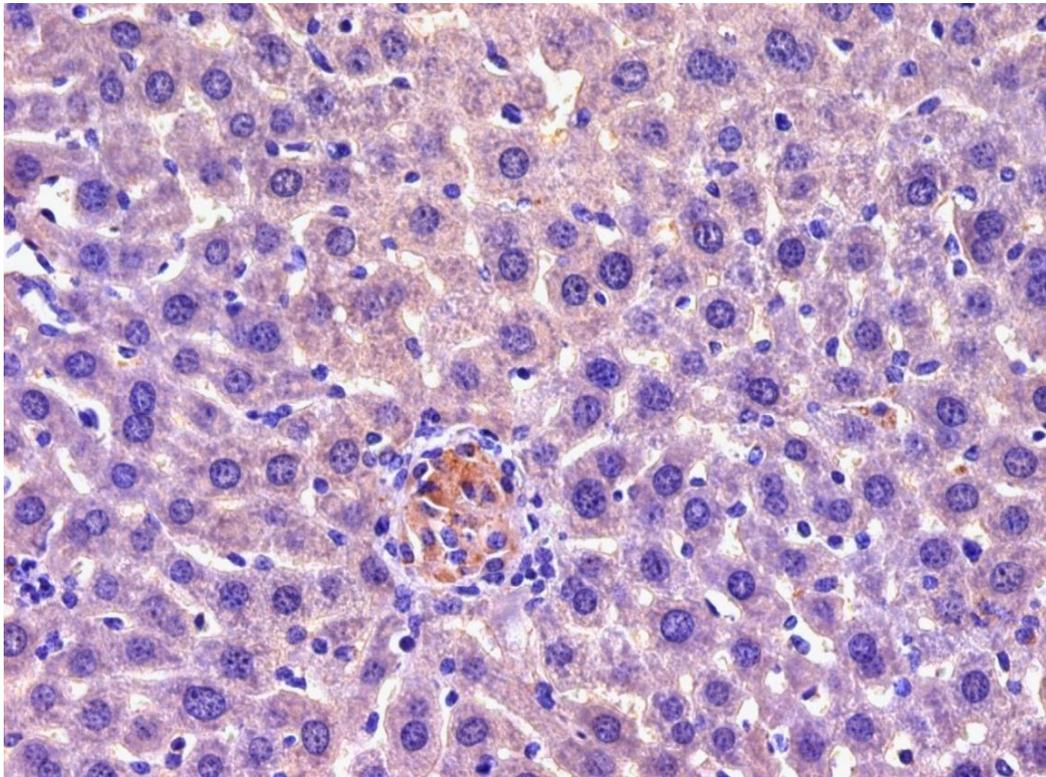


Рис.10. Увеличение x200. Печень, 2 мес. лечения. Окраска ИГХ на IL-6. 1 группа (зараженные БЦЖ, без лечения)