

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА «ХИКСОЗИД»

В.Я. Гергерт<sup>1</sup>, О.А. Попова<sup>2</sup>

### STUDY OF CYTOTOXICITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HIKSOZID

V.Ya. Gergert, O.A. Popova

Проведено сравнительное исследование противотуберкулезной активности препарата «Хиксозид» и изониазида и их действия на выработку противотуберкулезных и противоволекарственных антител у зараженных животных, на различные структуры бактериальных клеток, на развитие окислительного стресса и протеолитическую активность в клетках легких экспериментальных животных. Установлено достоверное снижение числа КОЕ микобактерий туберкулеза в легком инфицированных *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv у мышей, получавших ингаляции Хиксозида через две и четыре недели после начала лечения по сравнению с мышами контрольной группы. Достоверное увеличение титров противотуберкулезных IgG2 антител у мышей, получавших Хиксозид, в сравнении с зараженной контрольной группой наблюдали к 56-му дню исследования, тогда как при лечении изониазидом возрастали титры и уровни IgG1 антител. Исследование противоволекарственного ответа на конъюгаты изониазида и диоксида с BSA показало наличие IgG антител, нараставших при терапии хиксозидом и изониазидом (56-й день), увеличивались их аффинность и авидность, особенно при терапии Хиксозидом. При этом возрастали титры и уровни антиизониазидов IgG1 и IgG2b антител, тогда как ответ на диоксидин был обеспечен за счет увеличения титров IgG2b. Увеличения титров IgG2b против диоксида в группах зараженных животных, получавших изониазид и Хиксозид, свидетельствует о перекрестном и неспецифическом ответе на этот препарат, возникающем при заражении. По данным гистологических и биохимических исследований, ингаляционное введение Хиксозида интактным мышам не оказывает нежелательного влияния на структуру легочной паренхимы, а у зараженных животных демонстрирует выраженное положительное влияние на процессы заживления очагов воспаления в легких и восстановление структурно-функциональных характеристик.

**Ключевые слова:** экспериментальный туберкулез у мышей, антитела, хиксозид, диоксидин, изониазид.

The anti-tuberculosis activity of Hiksozid versus Isoniazid was studied in vivo and their effect on the on the generation of antituberculosis and anti-drug antibodies in inoculated animals. *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv-infected mice given inhaled Hiksozid 2 and 4 weeks after initiation of therapy, as compared to the control ones, showed was a significant drop in MBT CFU in the lung. At 56 day of the study, there was a significant rise in anti-tuberculosis IgG2a antibody titers in the Hiksozid group as compared to the inoculated control group whereas the titers and levels of IgG2a antibodies increased during Isoniazid therapy. Hiksozid therapy leads to an increase in the titer of anti-tuberculosis antibodies, but not in their levels, as observed during Isoniazid therapy. Investigation of an anti-drug response to the conjugates of Isoniazid demonstrated the presence of IgG antibodies that increased during therapy with Hiksozid and isoniazid (at day 56), their affinity and avidity rose particularly during Hiksozid therapy. At the same time, there were rises in the titers and levels of anti-isoniazid IgG1 and the levels of anti-isoniazid IgG2b antibodies whereas a response to dioxidin was observed due to the increased titers and level of IgG2b. In the groups of inoculated animals treated with isoniazid and Hiksozid, the higher titers and level of IgG2b against dioxidin are indicative of a cross and nonspecific response to this drug, which occurs after inoculation. According to histological and biochemical studies, inhalational administration Hiksozid intact mice has no adverse effects on the structure of the lung parenchyma, and the infected animals shows a marked positive effect on the dynamics of the processes of healing foci of inflammation in the lungs and restore the structural and functional characteristics.

**Keywords:** experimental tuberculosis in mice, antibodies, hiksozid, dioxidin, isoniazid.

<sup>1</sup> ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН», г. Москва

<sup>2</sup> ООО «МИР-ФАРМ», г. Москва

По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), одна треть всего населения мира инфицирована микобактериями туберкулеза (МБТ). В последние годы сохраняется высокий уровень заболеваемости туберкулезом (ТБ) легких в большинстве стран мира, включая Российскую Федерацию что, в частности, связано с появлением устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов МБТ, распространением множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), низкой эффективностью лечения противотуберкулезными препаратами. По данным ВОЗ, только в 2011 г. диагноз ТБ с МЛУ МБТ был установлен у 310 000 человек [6]. В последние годы ситуация усугубляется появлением устойчивости МБТ не только к рифампицину и изониазиду, но и к препаратам второго ряда – канамицину, амикацину, капреомицину и офлоксацину. В результате получает распространение ТБ с т.н. «широкой» лекарственной устойчивостью (ШЛУ) МБТ.

Среди больных ТБ с МЛУ МБТ доля пациентов с ШЛУ МБТ в мире в среднем составляет 9,0%, почти 60% больных ТБ с МЛУ МБТ приходится на Индию, Китай и занимающую третью ранговую позицию Российскую Федерацию [6]. В 2011 г. в России среди впервые выявленных больных ТБ МЛУ МБТ была выявлена в 19,1% случаев, среди больных с рецидивами заболевания – в 37,1%, во многих регионах страны данные показатели значительно выше [3].

В этих условиях особое значение приобретает поиск новых или усовершенствованных антибактериальных препаратов для лечения ТБ органов дыхания. Клиническая эффективность противотуберкулезных препаратов определяется многими факторами, среди которых важнейшими являются: уровень создаваемой бактериостатической и бактерицидной концентрации, степень проникновения действующего вещества в очаги поражения и активность в них, способность препаратов действовать на вне- и внутриклеточные (фагоцитированные) МБТ, переносимость больными препаратов.

Предлагаемый ООО «МИР-ФАРМ» препарат «Хиксозид» представляет собой комбинацию двух препаратов: антибактериального средства гидроксиметилхиноксалиндиоксида (диоксидин) и противотуберкулезного препарата изониазида в соотношении 1:2,5.

**Диоксидин** – антибактериальный бактерицидный препарат широкого спектра действия. Действует на штаммы бактерий, устойчивых к другим противомикробным лекарственным средствам, включая антибиотики.

**Изониазид** – противотуберкулезное средство, бактерицидный препарат, активный против организмов рода *Mycobacterium*, а именно против *M.tuberculosis*, *M.bovis* и *M.kansasii*. Он проявляет бактерицидное действие по отношению к быстро делящимся микобактериям, но является бактериостатическим, если микобактерии находятся в фазе медленного роста. Изониазид является пролекарством – ми-

кобактериальная каталаза-пероксидаза метаболизирует изониазид до активного метаболита, который, связываясь с еноил-(ацил-переносящий белок)-редуктазой синтазы жирных кислот I, нарушает превращение дельта 2-ненасыщенных жирных кислот в миколевую кислоту. Последняя представляет собой жирную кислоту с разветвленной цепью, которая, соединяясь с арабиногалактаном (полисахарид), участвует в образовании компонентов клеточной стенки *M.tuberculosis*. Изониазид также является ингибитором микобактериальной каталазы-пероксидазы, что снижает защиту микроорганизма против активных форм кислорода и пероксида водорода.

### Цель исследования

Сравнительное изучение цитотоксического действия и противотуберкулезной активности препарата хиксозид *in vivo* в отношении МБТ, чувствительных к противотуберкулезным препаратам, на модели экспериментального туберкулеза мышей при аэрогенном инфицировании.

В соответствии с поставленной целью в настоящем сообщении представлены материалы поэтапного исследования возможной цитотоксичности хиксозида и его влияния на течение туберкулеза.

### 1. Исследование с помощью lux-биосенсоров способности препарата «Хиксозид» вызывать окислительный стресс, повреждения мембран и повреждения ДНК бактерий (исследования проведены в ФГУП «ГосНИИгенетика»).

В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12: MG1655 *F-*ilvG rfb-50 rph-1** с ранее трансформированными гибридными плазмидами [1, 2, 10].

Для работы применяли следующие биосенсорные штаммы, позволяющие судить об основных типах повреждений бактериальной клетки:

- *E. coli* MG1655 с плазмидой pKatG-lux (окислительный стресс, связанный с появлением в клетке перекиси водорода или алкилгидроперекисей);
- *E. coli* MG1655 с плазмидой pSoxS-lux (окислительный стресс, связанный с появлением в клетке супероксид анион радикала);
- *E. coli* MG1655 с плазмидой pFabA-lux (повреждения мембран, приводящие к активизации биосинтеза жирных кислот);
- *E. coli* MG1655 с плазмидой pCoID-lux (детекция повреждений в ДНК, останавливающих репликационную вилку и вызывающих, как следствие, SOS-ответ бактерий);
- *E. coli* MG1655 с плазмидой plbp-lux (детекция повреждений, приводящих к агрегации белков клетки);
- *E. coli* MG1655 с плазмидой pLac-lux (конститутивный промотор для определения интегральной токсичности высоких концентраций препаратов).

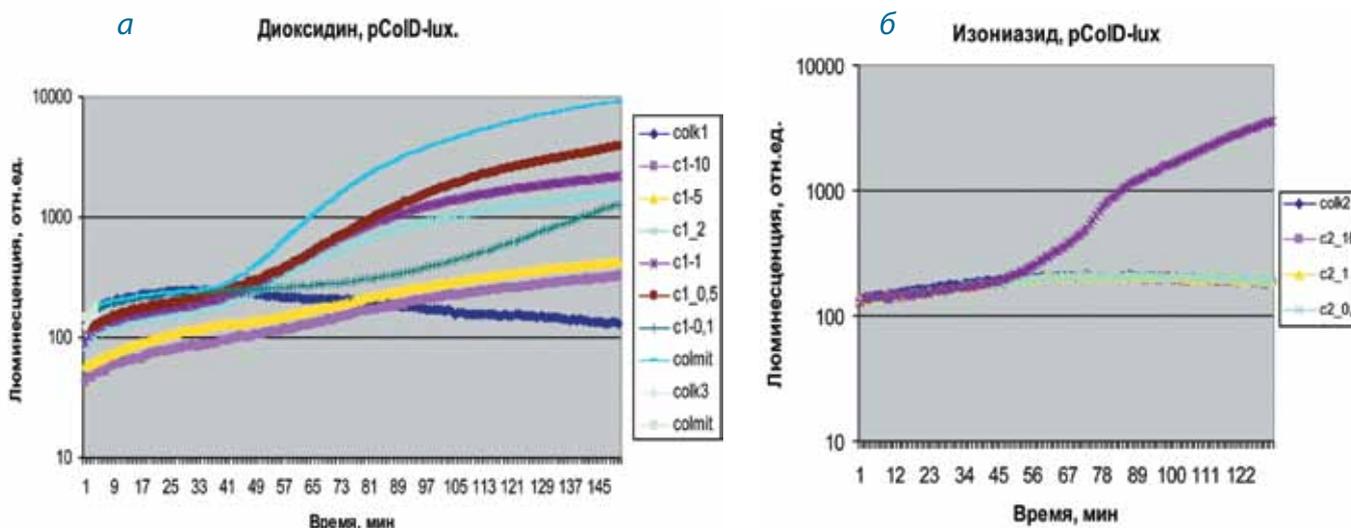


Рис. 1. Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD-lux) от времени инкубации в присутствии диоксидина (а) и изониазида (б).

colk1	контрольные клетки <i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) без добавления диоксидина	
c1-10	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 500 мкг/мл	+ изониазид 1,25 мг/мл
c1-5	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 250 мкг/мл	+ изониазид 625 мкг/мл
c1_2	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 100 мкг/мл	+ изониазид 250 мкг/мл
c1-1	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 50 мкг/мл	+ изониазид 125 мкг/мл
c1_0,5	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 25 мкг/мл	+ изониазид 62,5 мкг/мл
c1-0,1	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + диоксидин 5 мкг/мл	+ изониазид 12,5 мкг/мл
colmit	<i>E. coli</i> MG1655 (pColD-lux) + митомицин С 1 мкМ	

Изучение Хиксозида и его составляющих: диоксидина и изониазида проходило в несколько этапов.

Использование биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD-lux, для определения ДНК-тропного воздействия препаратов) показало (рис. 1 и 2), что диоксидин обладает мощным ДНК-тропным эффектом. Изониазид не способен повреждать ДНК и не вызывает индукцию SOS-промоторов. Диоксидин обладает слабой способностью к повреждению белков. Максимальный коэффициент индукции люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) составляет 1,5 и для подтверждения достоверности требует дополнительных измерений. Изониазид не способен повреждать белки и не вызывает индукцию промоторов теплового шока. Обработка клеток хиксозидом вызывает индукцию биолюминесценции биосенсора, сходную с полученной в эксперименте с диоксидином.

Данные измерений биолюминесценции биосенсоров *E. coli* MG1655 (pFabA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) в присутствии диоксидина, изониазида и хиксозида показали, что исследуемые препараты не вызывают окислительный стресс с помощью супероксиданион-радикалов или перекиси водорода. Исследуемые препараты не вызывают повреждений мембран клеток *E. coli*, которые могли бы привести к увеличению биосинтеза жирных кислот.

**2. Изучение биохимических процессов в органах мышей при действии препарата «Хиксозид» и его составляющих**

(исследования проведены в Институте проблем химической физики РАН).

Исследовано влияние препарата «Хиксозид» и изониазида на проявления окислительного стресса, протеолитической активности и экспрессии белков SOD-2, BAX и AIF в лизатах клеток печени и легкого животных при развитии заболевания, вызванного *M.tuberculosis*.

Развитие воспалительных реакций связано с запуском специализированных клеточных механизмов, направленных на восстановление клеточных и тканевых структур, либо на удаление необратимо поврежденных клеток. Основные молекулярные процессы в этом случае связаны с функционированием митохондрий. Так, в митохондриях локализуется один из ферментов антиоксидантной системы клетки – марганцевая супероксиддисмутаза (SOD-2), а также белок AIF, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях в митохондриях и запускающий процесс гибели клеток при накоплении в клеточном ядре. Белок BAX – мембранный белок митохондрий, который обеспечивает необратимый запуск процесса запрограммированной клеточной гибели – апоптоза.

**2.1. Исследование цитотоксичности компонентов препарата «Хиксозид»**

Для испытаний рост-ингибирующей активности препаратов клетки аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) рассевали в культуральные планшеты. Через 24 ч в среду добавляли исследуемые препараты в разных концентрациях. Через

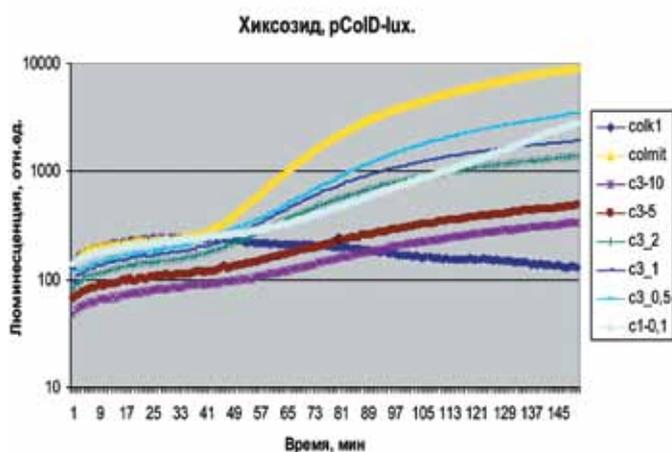


Рис. 2. Зависимость люминесценции биосенсора *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) от времени инкубации в присутствии Хиксозид. *colk1* – контрольные клетки *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) без добавления хиксозид

*c3-10* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 1,75 мг/мл  
*c3-5* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 875 мкг/мл  
*c3\_2* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 350 мкг/мл  
*c3\_1* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 175 мкг/мл  
*c3\_0,5* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 87,5 мкг/мл  
*c3\_0,1* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + хиксозид 17,5 мкг/мл  
*colmit* – *E. coli* MG1655 (*pColD-lux*) + митомицин С 1 мкМ

24 ч после внесения препаратов в среду добавлялся МТТ-краситель. Через 4 ч после внесения МТТ клетки лизировали, образование кристаллов МТТ-формазана в живых клетках определяли по оптической плотности полученных клеточных лизатов при 570 нм при фоновой длине волны 650 нм.

Использовали препарат диоксидин в конечной концентрации от 0,5 до 4,5 мМ и изониазид в конечной концентрации от 5 до 75 мМ. Проведено от пяти до семи независимых экспериментов, по результатам которых определены значения доз IC50 (концентрация препарата, вызывающая 50% снижение МТТ-окрашивания). Характерные кривые «доза-эффект» представлены на рис. 3.

Значения IC50 составили для диоксидина  $2,4 \pm 0,3$  мМ, для изониазида –  $44,4 \pm 6,2$  мМ. Таким образом, цитотоксичность диоксидина (2,4 мМ) теоретически соответствует дозе LD50 равной 2,88 г/кг, а изониазид по цитотоксичности сравним с физиологическим раствором, что позволяет определить их цитотоксичность как низкую и очень низкую, соответственно.

## 2.2. Исследование окислительного стресса, протеолитической активности и экспрессии белков SOD-2, BAX и AIF в лизатах клеток печени и легкого животных при развитии заболевания, вызванного *M.tuberculosis*

Для определения активности протеолитической активности в лизатах использовали метод Твининга [9]. 10 мкл лизата смешивали с 10 мкл FITC-меченного казеина и 20 мкл раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl, pH 7,2 и 8 мМ CaCl<sub>2</sub>. Смесь

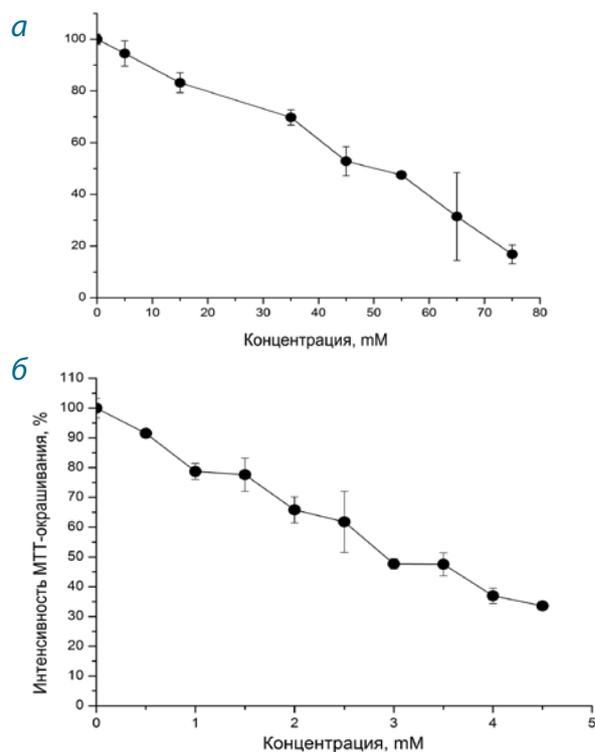


Рис. 3. Изменение МТТ-окрашивания клеток *HeLa* при действии диоксидина (а) и изониазида (б).

инкубировали 24 ч при 37°C, затем в нее добавляли 100 мкл 5% трихлоруксусной кислоты и инкубировали 1 ч при комнатной температуре и 24 ч при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием, супернатант использовали для дальнейшего анализа на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония).

Результаты измерения количества продуктов перекисного окисления липидов – реактивных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБКРП) и протеолитической активности представлены в табл. 1.

Таким образом, в ходе заболевания в клетках печени и легких наблюдается развитие окислительного стресса, при этом в легких через 30-45 дней после начала заболевания окислительный стресс выражен в большей степени. Лечение как Хиксозидом, так и изониазидом, как правило, снижает проявления окислительного стресса.

Более высокое количество ТБКРП в лизатах клеток легких при применении Хиксозиды не обязательно связано с инфекцией, продукция ТБКРП может быть увеличена из-за активации продукции активного кислорода клетками иммунной системы. При применении Хиксозиды методом ингаляций его составляющие, в основном, метаболизируются в легких, поэтому в клетках печени их побочное действие может не проявляться.

Отмечено также повышение протеолитической активности в клетках печени и легких при развитии заболевания, вызванного *M.tuberculosis*. Изменение активности протеаз, как в печени, так и в легких может быть связано с активацией иммунного

Табл. 1. Количество реактивных продуктов тиобарбитуровой кислоты в клеточных лизатах

Лизат	мкМ ТБКРП / мг белка	Активность протеаз белка (мкК/мг)
«П0» – контрольные животные	5,40	0,97
«П30» – животные через 30 дней после начала заболевания	18,0	2,48
«П45» – животные через 45 дней после начала заболевания	26,10	1,60
«П45Х15» животные через 45 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 15 дней Хиксозидом	0,0	1,81
«П45И15» – животные через 45 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 15 дней изониазидом	5,50	1,49
«П60» – животные через 60 дней после начала заболевания	32,20	0,60
«П60Х30» – животные через 60 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 30 дней Хиксозидом	16,10	0,50
«П60И30» – животные через 60 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 30 дней изониазидом	13,20	0,53
«Л0» – контрольные животные	19,50	1,19
«Л30» – животные через 30 дней после начала заболевания	21,60	3,02
«Л45» – животные через 45 дней после начала заболевания	55,20	3,23
«Л45Х15» – животные через 45 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 15 дней Хиксозидом	24,00	4,57
«Л45И15» – животные через 45 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 15 дней изониазидом	14,60	4,16
«Л60» – животные через 60 дней после начала заболевания	25,40	9,82
«Л60Х30» – животные через 60 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 30 дней Хиксозидом	26,00	0,46
«Л60И30» – животные через 60 дней после начала заболевания, которые лечились в течение 30 дней изониазидом	16,20	0,43

ответа. В частности, хорошо известно повышение активности протеаз в легких в ходе воспаления при респираторных инфекциях [5]. В образце «Л60» активный протеолиз связан, вероятно, также и с процессом некроза ткани. Лечение Хиксозидом и изониазидом блокирует возрастание протеазной активности, очевидно, за счет подавления инфекции. В печени не отмечено существенного влияния Хиксозида и изониазида на активность протеолиза.

Исследование экспрессии разных функциональных групп (SOD-2, BAX и AIF) в клеточных лизатах печени (П) и легких (Л) в иммуноблоттинге с антителами к указанным белкам представлены на рис. 4.

Экспрессия белка SOD-2 изменялась в незначительных пределах, повышение отмечали на начальной стадии заболе-

вания, а в целом отмечена корреляция с количеством ТБКРП. Экспрессия белка BAX, в целом, коррелирует с протеолитической активностью в тканях, а экспрессия белка AIF в печени коррелирует с интенсивностью окислительного стресса (табл. 2).

Проявления патологии снимаются при использовании препарата «Хиксозид» и изониазида почти по всем параметрам, за исключением протеолитической активности через 45 дней после начала заболевания.

**3. Влияние препарата «Хиксозид» на жизнеспособность и функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда (исследования проведены в ФГБУ «ЦНИИТ РАМН»).**

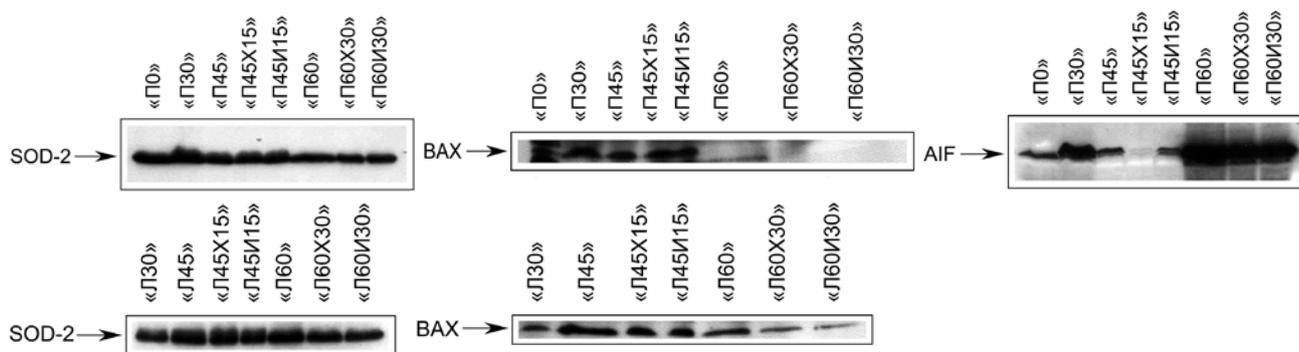


Рис. 4. Результаты иммуноблоттинга клеточных лизатов печени (П) и легких (Л) с антителами к марганцевой супероксиддисмутазе (SOD-2), BAX, AIF.

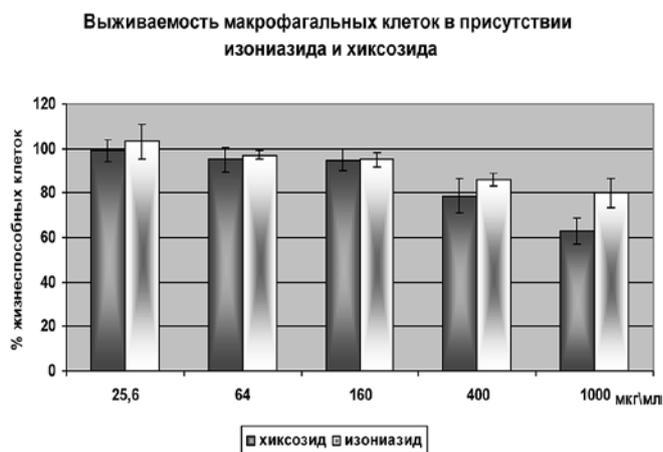
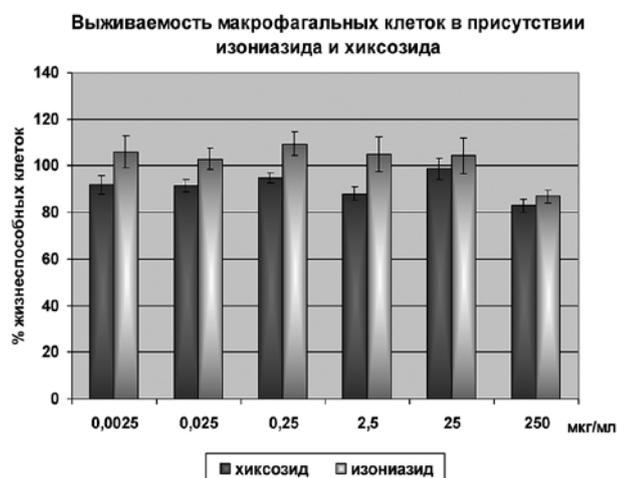


Рис. 5. Выживаемость макрофагальных клеток линии THP-1 в присутствии различных концентраций Хиксозида и изониазида.

Для экспериментов *in vitro* использовали перевиваемую культуру острой моноцитарной лейкемии человека THP-1. Клетки культивировали на среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в атмосфере, обогащенной 5% CO<sub>2</sub>.

Для дифференцировки моноцитов в макрофаги *in vitro* использовали препарат форболового эфира (PMA) в концентрации 10<sup>-7</sup>M (Sigma). Для постановки МТТ-теста использовали 96-луночные планшеты (Nunc). Инкубирование клеток в присутствии препаратов проводили в течение 72 часов. Стандартный МТТ-тест предполагает оценку зависимости продукции формазана (растворенного и экстрагированного из клеток органическим растворителем ДМСО) от числа жизнеспособных клеток в образце по оптической плотности (ОП) раствора на спектрофотометре при длине волны 530 нм (чем больше в образце жизнеспособных клеток, тем выше ОП экстрагированного формазана). Оценку выживаемости клеток в присутствии Хиксозида проводили по результатам трех тестов для каждого варианта постановки эксперимента. В качестве контроля проводили оценку выживаемости клеток в присутствии изониазида.

Оценку функциональной активности макрофагов проводили следующим образом. После дифференцировки моноцитарных клеток в макрофагальные в среду культивирования вводили Хиксозид в концентрации 25, 100 и 250 мкг/мл на 48 ч. Экспериментальные концентрации Хиксозида рассчитывали исходя из содержания в препарате изониазида. В конце инкубации в среду на 2 ч добавляли латексные шарики (FluoScherе), меченные FITC. Затем клетки 20 мин фиксировали 10% параформальдегидом на фосфатно-солевом буфере (pH 7,2-7,4), докрашивали ядерным красителем DAPI. Распределение латексных частиц в цитоплазме клеток определяли методом конфокальной лазерной микроскопии на микроскопе SPE (Leica). Для подсчета фагоцитарного индекса отсняли поля зрения случайным образом и использовали программу Image J.

Оценку состояния лизосомного компартмента проводили методом прижизненного окрашивания акридиновым оран-

жевым с подсчетом клеток на 100 полей зрения, выбранных случайным образом, в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе SPE Leica. В качестве экспериментальных использовали концентрации Хиксозида 25, 100 и 250 мкг/мл, вводимые в среду культивирования на 48 ч. Экспериментальные концентрации Хиксозида рассчитывали исходя из содержания в препарате изониазида.

### 3.1. Определение диапазона токсичных концентраций препарата «Хиксозид» для макрофагальных клеток.

При определении возможного диапазона токсичных концентраций Хиксозида в сравнении с изониазидом для макрофагов на первом этапе использовали концентрации препаратов с шагом разведения в 10 раз (от 0,0025 до 250 мкг/мл). Некоторое снижение доли жизнеспособных клеток наблюдали лишь при концентрации 250 мкг/мл, как в присутствии Хиксозида, так и изониазида (рис. 5).

На втором этапе оценки цитотоксического действия препаратов на клетки макрофагального ряда использовали концентрации от 25 до 1000 мкг/мл с шагом разведения в 2,5 раза. Некоторое снижение процента жизнеспособных клеток макрофагального ряда наблюдали при концентрациях обоих препаратов 400 мкг/мл и выше.

### 3.2. Влияние препарата «Хиксозид» на фагоцитарную активность макрофагальных клеток (метод конфокальной лазерной микроскопии).

Анализ фагоцитарной активности (подсчет фагоцитарного индекса) показал, что при всех использованных концентрациях изониазида (25, 100, 250 мкг/мл) 38-43% клеток в популяции являлись активно фагоцитирующими. Вместе с тем, при тех же концентрациях Хиксозида (25, 100, 250 мкг/мл) активно фагоцитирующими являлись уже 43-47% макрофагальных клеток.

### 3.3. Оценка влияния препарата «Хиксозид» на кислотный (лизосомный) компартмент макрофагальных клеток.

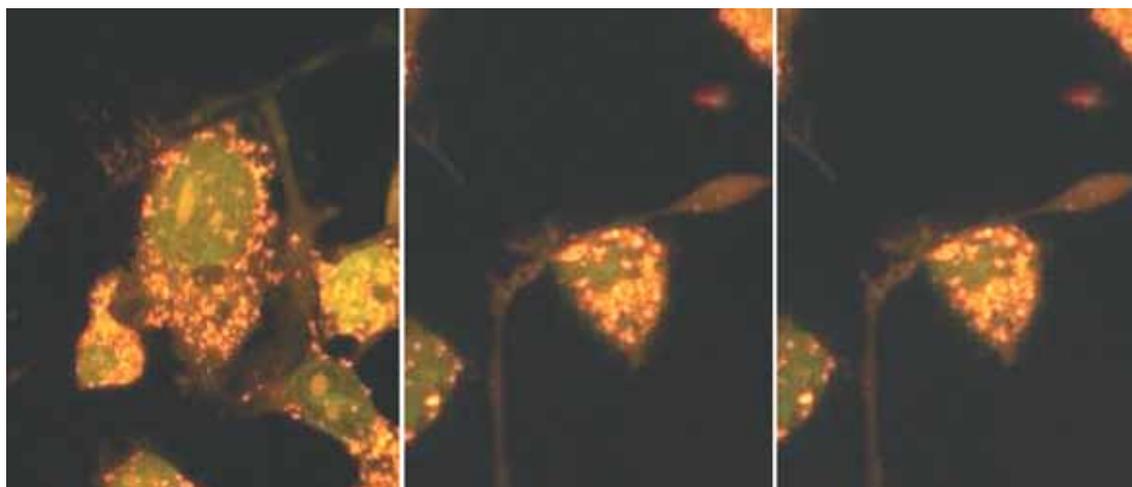


Рис. 6. Лизосомный компартмент в макрофагальных клетках при действии изониазида, зеленый цвет – ядра, оранжевый – лизосомы (кислотный компартмент).

При оценке влияния препаратов на состояние соматических клеток важным фактором является их влияние на состояние лизосомного компартмента.

Анализ распределения лизосомного компартмента в макрофагальных клетках при действии разных концентраций Хиксозид (25, 100 и 250 мкг/мл) показал, что в неполярных клетках лизосомы более интенсивно заполняют околядерную зону, практически отсутствуя на периферии цитоплазмы и в отростках (рис. 6).

В полярных клетках, характеризующихся длинными отростками, наблюдали перераспределение лизосомного компартмента, по сравнению с изониазидом. Если при действии изониазида в отростках выявляли единичные лизосомы, то при действии Хиксозид лизосомы локализовались как в околядерной области, так и в отростках (рис. 7).

Изменение локализации лизосомного компартмента свидетельствует об активации фагоцитарной функции в этой части популяции макрофагальных клеток при лечении Хиксозидом.

**4. Сравнительное изучение действия препарата «Хиксозид» на *M.tuberculosis*, клеточный состав и продукцию цитокинов в легочной ткани у экспериментальных животных, аэрозольно зараженных вирулентным штаммом H<sub>37</sub>Rv (исследования проведены в ФГБУ «ЦНИИТ РАМН»).**

Активность препарата «Хиксозид» *in vivo* в отношении *M.tuberculosis*, чувствительных к противотуберкулезным препаратам, определяли на модели экспериментального туберкулеза у самок инбредных мышей линии BALB/c при аэрогенном инфицировании *M. tuberculosis* штамма H<sub>37</sub>Rv в дозе 100 КОЕ на легкое. Хиксозид (250 мг по содержанию изониазида)

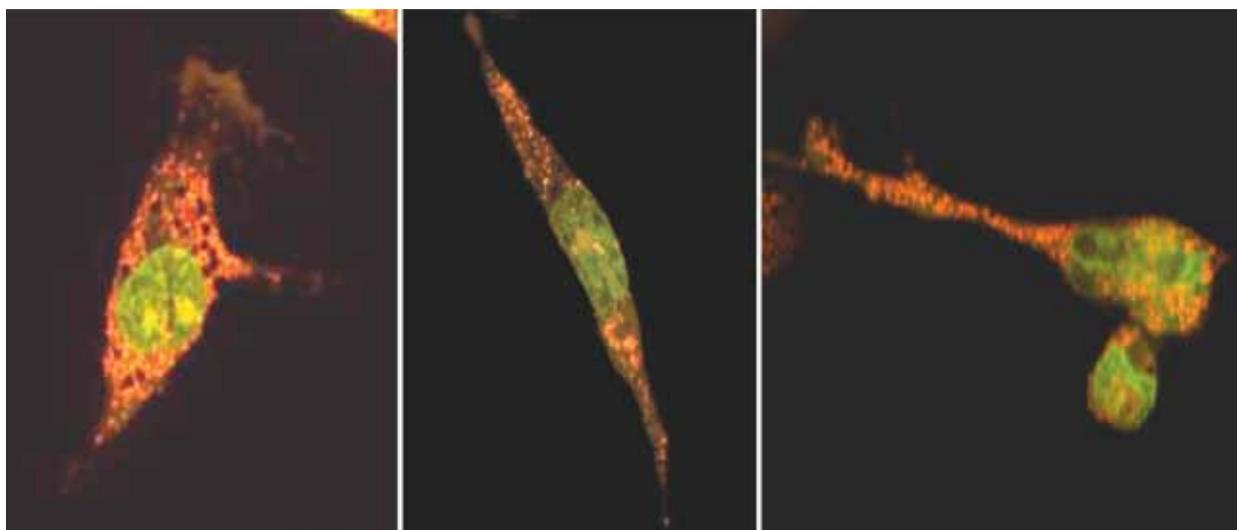


Рис. 7. Лизосомный компартмент в макрофагальных клетках при действии Хиксозид. В длинных тонких отростках присутствует окрашивание, характерное для лизосом: зеленый цвет – ядра, оранжевый – лизосомы (кислотный компартмент).

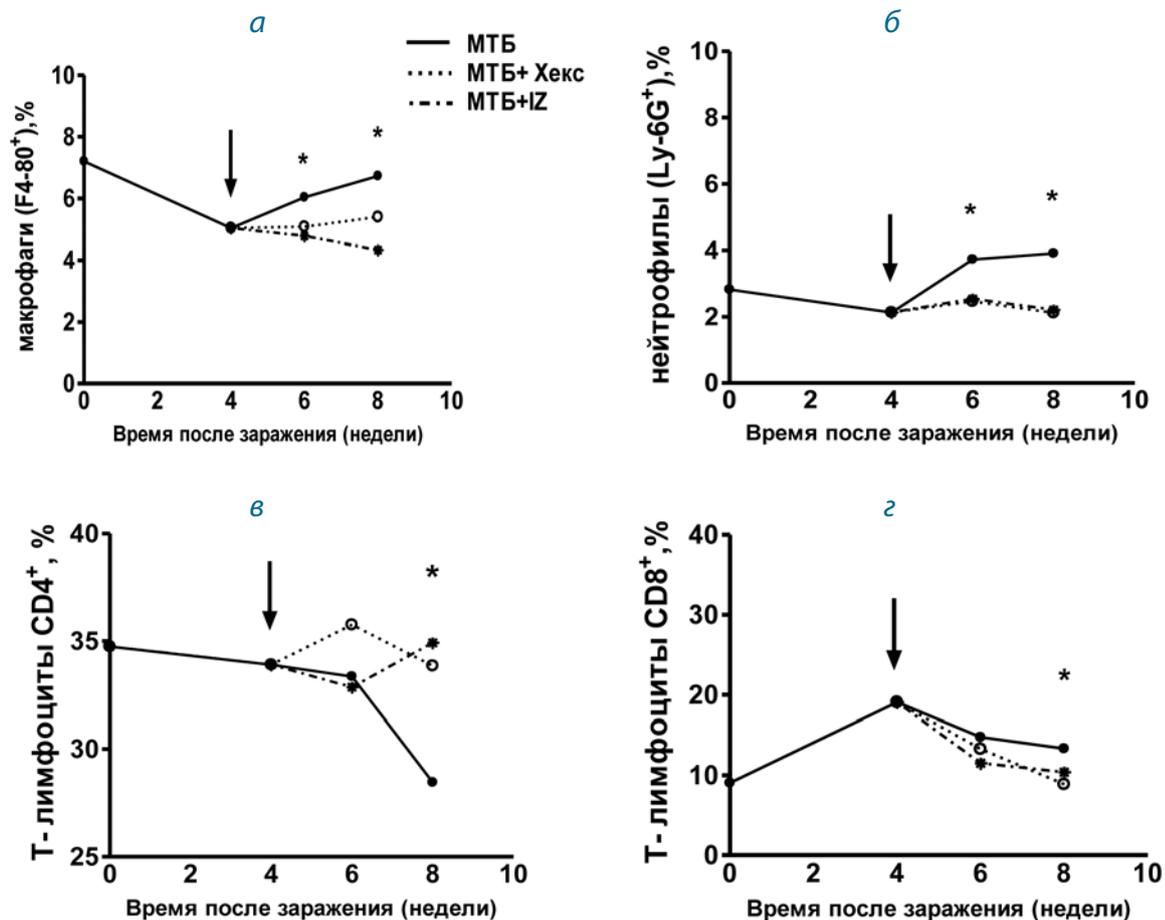


Рис. 8. Клеточный состав (%) инфильтрата легочной ткани у мышей контрольной (MTB) и опытных групп (MTB+Хикс – получавшие Хиксозид, MTB+ИЗ – получавшие изониазид): а) макрофаги (F4-80<sup>+</sup>); б) нейтрофилы (Ly-6G<sup>+</sup>); в) T-лимфоциты CD4<sup>+</sup>; г) T-лимфоциты CD8<sup>+</sup>. Стрелкой указано время начала лечения. \*  $p < 0,01$  по сравнению с группой, не получавшей лечения.

предварительно растворяли в 10 мл физиологического раствора (согласно инструкции) и 7 мл готового раствора наливали в небулайзер. Распыление проводили в специальной камере ежедневно в течение 20 мин на протяжении одного месяца после четырех недель от момента заражения. Изониазид распыляли аналогичным образом (250 мг в 10 мл физиологического раствора).

#### 4.1. Высеваемость *M.tuberculosis* из легких в процессе лечения экспериментального туберкулеза препаратом «Хиксозид» и изониазидом.

Легкое гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серию 10-кратных разведений исходной суспензии в физиологическом растворе и 50 мкл каждого разведения помещали на чашку Петри с агаром Дьюбо. Чашки Петри с нанесенными суспензиями клеток легкого или селезенки инкубировали в течение 21 дня при 37°C, после чего подсчитывали число колоний на чашке и определяли количество КОЕ *M.tuberculosis* в легких (табл. 2).

Табл. 2. Высеваемость *M.tuberculosis* из легких у мышей через месяц после аэрогенного инфицирования и на фоне ингаляций Хиксозида и изониазида

Группа животных	Число КОЕ/легкое (M ± SEM)		
	Перед лечением	2 недели лечения	4 недели лечения
Контроль (1)	3,60±0,23×10 <sup>7</sup>	3,10±0,09×10 <sup>7</sup>	3,50±1,60×10 <sup>7</sup>
Хиксозид (2)		9,35±2,13×10 <sup>6</sup>	1,35±0,15×10 <sup>6</sup>
Изониазид (3)		9,87±2,21×10 <sup>6</sup>	4,90±0,93×10 <sup>6</sup>

- различия между контрольной и опытными группами достоверны ( $p = 0,018$  и  $0,011$ )
- различия между группами 2 и 3 недостоверны ( $p = 0,87$ ) через 2 недели после инфицирования
- различия между группами 2 и 3 достоверны через 4 недели после начала лечения 9 ( $p < 0,05$ )

У мышей контрольной группы (1), зараженных вирулентным штаммом H<sub>37</sub>Rv и не получавших никаких препаратов, количество КОЕ к моменту начала лечения составило 3,60 ± 0,23 × 10<sup>7</sup> и в последующем сохранялось на том же уровне. У инфицированных мышей, получавших ингаляции Хиксозида и изониазида, количество КОЕ через 2 недели после начала лечения достоверно снизилось по сравнению с контрольной группой,

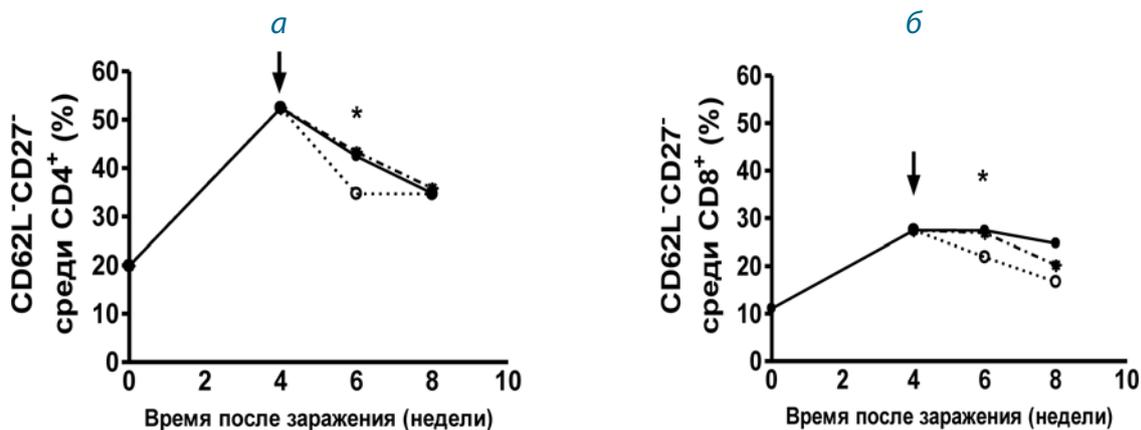


Рис. 9. Содержание в легких у мышей контрольной (МТБ) и опытных групп (МТБ+Хикс – получавшие Хиксозид, МТБ+ИЗ – получавшие изониазид) высокодифференцированных Т лимфоцитов CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (%): а) среди лимфоцитов CD4<sup>+</sup>; б) среди лимфоцитов CD8<sup>+</sup>. Обозначения кривых – как на рис. 8. Стрелкой указано время начала лечения. \*  $p < 0,01$  по сравнению с группой, не получавшей лечения.

но не отличалось друг от друга. Через 4 недели после начала лечения отмечено дальнейшее снижение количества КОЕ в легких мышей, получавших лечение, более заметное ( $p < 0,05$ ) в группе, получавших Хиксозид.

#### 4.2. Динамика клеточного состава и жизнеспособности клеток легочной ткани мышей при заражении вирулентными штаммами *M.tuberculosis* и лечении препаратом «Хиксозид».

Опытных мышей усыпляли, вводя 200 мкл раствора тиопентала (0,1 мг/мл). Извлекали среднюю и нижнюю доли правого легкого, измельчали, добавляли среду, содержащую 200 Ед/мл коллагеназы Ia, 50 Ед/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США), и инкубировали 1,5 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем суспензию пипетировали, отстаивали, надосадочную жидкость с клетками легкого отмывали центрифугированием и подсчитывали клетки на гематологическом анализаторе Coulter A-Tdiff (Beckman Coulter, США).

Клеточный состав легочной ткани определяли при проточной цитометрии (FACSSort, BD, США). Определяли содержание макрофагов (фенотип F4-80+), нейтрофилов (Ly-6G<sup>+</sup>), Т лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) и лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> [7, 8].

Для выявления живых и мертвых клеток к пробам, содержащим смеси антител, добавляли краситель LIVE/DEAD (LIVE/DEAD Far Red Fluorescent Reactive Dye, Invitrogen, США). Для выявления апоптотических клеток пробы окрашивали аннексином V (Annexin V-FITC, Invitrogen, США).

Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического теста Манна-Уитни.

У мышей, инфицированных *M.tuberculosis*, наблюдали увеличение процентного содержания макрофагов и нейтрофилов (рис. 8) на поздних стадиях инфекции ( $p < 0,05$ , через шесть и восемь недель после инфицирования). В эти же сроки отмечали дальнейшее достоверное снижение процентного содержания лимфоцитов CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ) и постепенное уменьшение количества лимфоцитов CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ) после пика через

четыре недели после инфицирования. Лечение Хиксозидом приводило к достоверному уменьшению доли макрофагов и нейтрофилов в легочной ткани зараженных мышей по сравнению с контролем, особенно через шесть и восемь недель после заражения, процентное содержание CD4<sup>+</sup> лимфоцитов увеличивалось до нормальных величин и было достоверно выше соответствующих значений в контрольной группе в тот же период наблюдения. Процентное содержание CD8<sup>+</sup> клеток у зараженных мышей обнаруживало тенденцию к постепенному снижению через две и, особенно, через четыре недели после назначения Хиксозид. Примерно к тем же эффектам приводило лечение изониазидом.

Следовательно, Хиксозид и изониазид оказывали сопоставимое влияние на формирование и динамику клеточного состава инфильтрата легочной ткани.

При исследовании содержания в легочной ткани высокодифференцированных субпопуляций лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> (лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) установлено, что развитие туберкулезной инфекции сопровождалось значительным увеличением обеих исследованных субпопуляций лимфоцитов (рис. 9). Процентное содержание этих клеток увеличивалось в 1,5-3,0 раза в первые четыре недели после заражения ( $p < 0,01$ , тест Манна-Уитни). На фоне применения Хиксозид отмечено достоверное снижение содержания высокодифференцированных эффекторов CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> в популяциях лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> через две недели лечения ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем и тенденция к снижению содержания эффекторов CD62L<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> в популяции лимфоцитов CD8<sup>+</sup> через четыре недели лечения. При анализе результатов применения изониазида достоверных различий в содержании этих клеток в популяциях лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> через четыре недели после начала лечения отмечено не было, как в случае применения обоих препаратов, так и по сравнению с контролем.

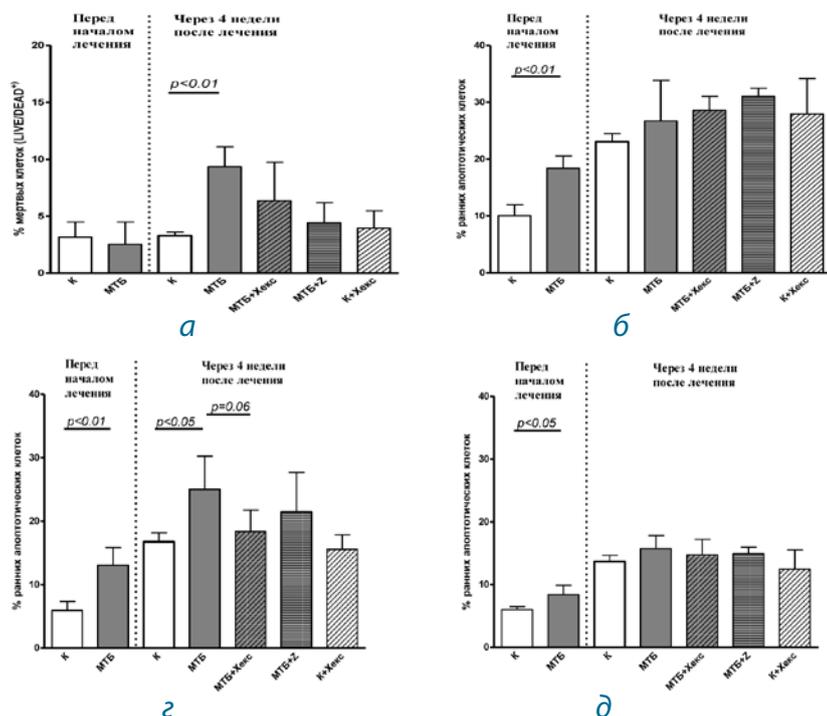


Рис. 10. Апоптоз иммунных клеток у мышей контрольных (К – неинфицированные *M.tuberculosis*, МТБ – инфицированные и не получавшие лечения) и опытных групп (МТБ+Хикс – получавшие Хиксозид, МТБ+ИЗ – получавшие изониазид, К+Хикс – неинфицированные, но получавшие Хиксозид). Процентное содержание мертвых клеток LIVE/DEAD<sup>+</sup> (а) и ранних апоптотических клеток (Anp+) среди макрофагов F4-80<sup>+</sup> (б), нейтрофилов Ly-6G<sup>+</sup> (в), Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> (г) и CD8<sup>+</sup> (д).

Таким образом, при краткосрочном четырехнедельном наблюдении после начала лечения удалось обнаружить более быстрое (через две недели) снижение CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> клеток при применении Хиксозида в сравнении как с контрольной группой, так и с группой животных, получавших изониазид.

Негативного влияния хиксозида на гибель и апоптоз клеток в легких неинфицированных мышей выявлено не было (рис. 10). Лечение Хиксозидом туберкулезной инфекции приводило к снижению доли апоптотических клеток среди лимфоцитов CD4<sup>+</sup> в сравнении с контрольной группой зараженных животных, тогда как при отсутствии лечения среди нейтрофилов (рис. 10в) отмечена тенденция к повышенному содержанию апоптотических клеток ( $p = 0,06$ ), в т. ч. и среди Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ , рис. 10г).

#### 4.3. Динамика продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α в легочной ткани при лечении препаратом «Хиксозид» экспериментального туберкулеза у мышей.

Продукцию цитокинов определяли в супернатантах гомогенатов легочной ткани методом ИФА при помощи наборов Mouse IL-1beta ELISA Ready-SET-Go!, Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!, Mouse TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go! (Bioscience, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического теста Манна-Уитни.

У инфицированных мышей по сравнению с интактными отмечено высокое содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6 через четыре недели после инфицирования с тенденцией к дальнейшему повышению (рис. 11).

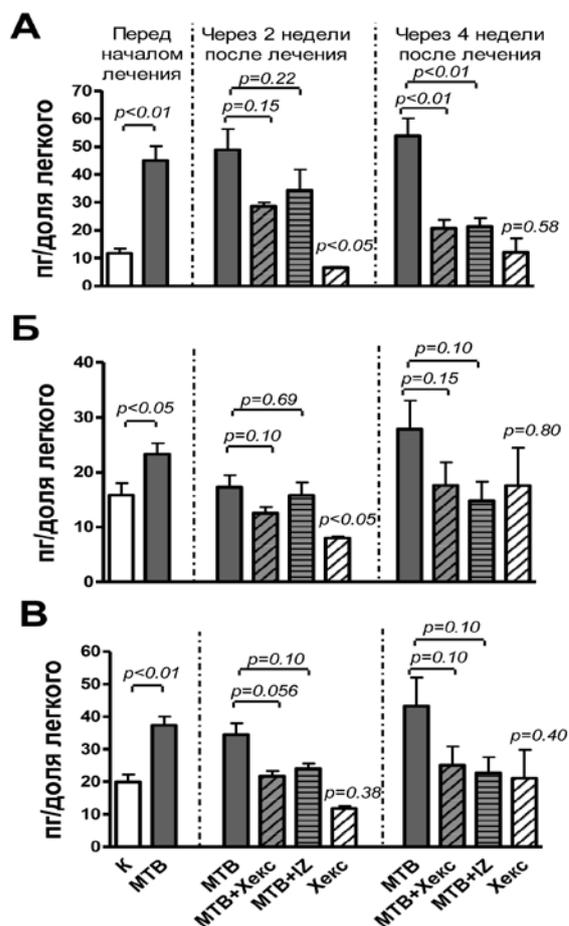


Рис. 11. Продукция провоспалительных цитокинов ИЛ-1β (а), ИЛ-6 (б), ФНО-α (в) в легочной ткани у мышей контрольных (К – неинфицированные *M.tuberculosis*, МТБ – инфицированные и не получавшие лечения) и опытных групп (МТБ+Хикс – получавшие Хиксозид, МТБ+ИЗ – получавшие изониазид, К+Хикс – неинфицированные, но получавшие Хиксозид).

Табл. 3. Титр и уровень противотуберкулезных и противолекарственных IgG в исследуемых группах мышей

	Титр (M ± m)	1:100 (M ± m)	1:300 (M ± m)	1:900 (M ± m)	1:2700 (M ± m)
<b>CF</b>					
Ctrl 28d	305 ± 87	0,270 ± 0,107	0,113 ± 0,052	0,043 ± 0,019	0,024 ± 0,013
Ctrl-Mtb 28d	254 ± 125	0,084 ± 0,033	0,035 ± 0,013	0,012 ± 0,004	0,005 ± 0,003
Ctrl-Mtb 42d	1 628 ± 906	0,887 ± 0,342	0,620 ± 0,281	0,315 ± 0,155	0,173 ± 0,089
Ctrl-Mtb 56d	2 195 ± 376	1,160 ± 0,289	0,800 ± 0,216	0,406 ± 0,116	0,191 ± 0,047
INH Mtb 42d	833 ± 257 *	0,605 ± 0,223	0,337 ± 0,145	0,125 ± 0,059 **	0,052 ± 0,030 **
INH Mtb 56d	4 112 ± 1 151	1,798 ± 0,280	1,341 ± 0,284	0,763 ± 0,175	0,474 ± 0,121 **
Hiks Ctrl 42d	1 476 ± 1 235	0,045 ± 0,009 ***	0,021 ± 0,009 ***	0,014 ± 0,010 ***	0,006 ± 0,005 ***
Hiks Ctrl 56d	373 ± 219 ***	0,301 ± 0,238	0,147 ± 0,119	0,059 ± 0,045 ***	0,023 ± 0,016 ***
Hiks Mtb 42d	1 646 ± 769	0,523 ± 0,223	0,377 ± 0,217	0,187 ± 0,128	0,081 ± 0,059
Hiks Mtb 56d	8 274 ± 6 299 ***	1,093 ± 0,156	0,785 ± 0,199	0,507 ± 0,190	0,327 ± 0,153 **
<b>BSA-INH</b>					
Ctrl 28d	268 ± 86	0,084 ± 0,012	0,030 ± 0,005	0,011 ± 0,002	0,004 ± 0,002
Ctrl-Mtb 28d	303 ± 119	0,051 ± 0,009	0,020 ± 0,004	0,008 ± 0,002	0,004 ± 0,002
Ctrl-Mtb 42d	342 ± 152	0,143 ± 0,070	0,071 ± 0,041	0,026 ± 0,013	0,014 ± 0,009
Ctrl-Mtb 56d	239 ± 83	0,081 ± 0,028	0,031 ± 0,012	0,010 ± 0,004	0,005 ± 0,002
INH Mtb 42d	168 ± 77	0,126 ± 0,051	0,044 ± 0,022	0,020 ± 0,012	0,009 ± 0,007
INH Mtb 56d	242 ± 107	0,175 ± 0,084 **	0,072 ± 0,038 **	0,024 ± 0,014 ***	0,013 ± 0,008 ***
Hiks Ctrl 42d	309 ± 77	0,152 ± 0,056 **	0,054 ± 0,022 **	0,017 ± 0,007 **	0,004 ± 0,002
Hiks Ctrl 56d	414 ± 144 ***	0,149 ± 0,053 ***	0,058 ± 0,024 ***	0,020 ± 0,008 ***	0,005 ± 0,002 ***
Hiks Mtb 42d	329 ± 194	0,070 ± 0,017 ***	0,026 ± 0,011 ***	0,008 ± 0,003 ***	0,004 ± 0,002 ***
Hiks Mtb 56d	1497 ± 1215 ***	0,788 ± 0,516 ***	0,566 ± 0,450 ***	0,349 ± 0,295 ***	0,174 ± 0,148***
<b>BSA-DO</b>					
Ctrl 28d	293 ± 156	0,092 ± 0,010	0,033 ± 0,007	0,014 ± 0,003	0,003 ± 0,001
Ctrl-Mtb 28d	325 ± 93	0,146 ± 0,077	0,048 ± 0,028	0,020 ± 0,010	0,008 ± 0,006
Ctrl-Mtb 42d	271 ± 86	0,311 ± 0,194	0,145 ± 0,105	0,057 ± 0,044	0,031 ± 0,027
Ctrl-Mtb 56d	471 ± 174	0,090 ± 0,022	0,031 ± 0,009	0,009 ± 0,003	0,004 ± 0,001
INH Mtb 42d	206 ± 57	0,102 ± 0,035 ***	0,028 ± 0,012 ***	0,007 ± 0,003 ***	0,002 ± 0,001 ***
INH Mtb 56d	287 ± 181	0,429 ± 0,276 ***	0,196 ± 0,143 ***	0,072 ± 0,053 ***	0,032 ± 0,025 ***
Hiks Ctrl 42d	245 ± 169 **	0,037 ± 0,004 **	0,008 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,000 ***
Hiks Ctrl 56d	267 ± 66 **	0,041 ± 0,004 ***	0,011 ± 0,002 ***	0,003 ± 0,001 ***	0,001 ± 0,000 ***
Hiks Mtb 42d	105 ± 29	0,062 ± 0,010 *	0,017 ± 0,003 ***	0,006 ± 0,001 ***	0,003 ± 0,001 ***
Hiks Mtb 56d	1 035 ± 335	0,730 ± 0,279 ***	0,363 ± 0,140 ***	0,142 ± 0,056 ***	0,062 ± 0,026 ***

\* достоверность различий с контрольной зараженной группой с  $p < 0,05$ ;

\*\* достоверность различий с контрольной зараженной группой с  $p < 0,01$ ;

\*\*\* достоверность различий с контрольной зараженной группой с  $p < 0,001$ .

Применение Хиксозида привело к достоверному снижению их продукции, причем этот эффект был сравним с таковым при лечении изониазидом.

Следовательно, отмеченные изменения продукции провоспалительных цитокинов отражают общую тенденцию к их снижению, связанную с уменьшением воспалительных изменений в процессе лечения и, очевидно, параллельно снижению бактериальной нагрузки. Следует еще раз подчеркнуть, что положительный эффект применения Хиксозида не уступал таковому при назначении изониазида.

#### 4.4. Выработка противотуберкулезных и противолекарственных антител у инфицированных и интактных животных при действии терапевтических доз препарата «Хиксозид».

Сывороточные антитела против микобактериальных антигенов культурального фильтрата (CF) *M.tuberculosis* штамма H<sub>37</sub>Rv, биокопюлятов с лекарственными препаратами (BSA-INH, BSA-DO) и с BSA определяли в непрямом иммуноферментном анализе [4]. Исследовали антитела общего IgG, подклассов IgG1, IgG2a и классов IgA и IgM. На 28-й день эксперимента брали кровь у контрольной группы интактных животных (Ctrl 28d) и

у зараженных 100 КОЕ *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (Ctrl-Mtb 28d). Кровь также брали на 42 день (6 недель) и 56 день (8 недель) у зараженных мышей (Ctrl-Mtb 42d и 56d) и получавших терапию изониазидом (INH Mtb 42d или 56d) и Хиксозидом (Hiks Mtb 42d или 56d), а также у интактных мышей, получавших терапию Хиксазидом (Hiks Ctrl 42d или 56d).

Терапия Хиксозидом зараженных мышей приводила к достоверному увеличению титров (аффинности) противотуберкулезных антител IgG (табл. 3) и IgM классов, особенно к восьмой неделе эксперимента, при этом уровни антител оставались ниже таковых в контрольной группе мышей на всех исследуемых сроках. Исследования подклассов противотуберкулезных IgG показывают, что изменения в аффинности происходят в основном за счет IgG2a и, частично, IgG2b антител.

Противолекарственные IgG антитела, направленные против изониазида и диоксидина, нарастали при терапии как Хиксозидом так и изониазидом, достигая наибольших показателей на восьмой неделе эксперимента, при этом достоверно увеличивались как титры, так и уровни IgG в сравнении с контрольной группой зараженных животных, не получавших терапии.

Анализ подклассов противолекарственных IgG антител показал, что повышение ответа против изониазида происходит в основном за счет IgG1 антител, тогда как ответ на диоксидин наблюдали за счет достоверного увеличения титров и уровня IgG2b антител.

В группе интактных (не зараженных) мышей, которым параллельно вводили Хиксозид, титры и уровни противолекарственных антител были незначительными.

Следовательно, противолекарственные антитела образуются в организме животных в основном при наличии и развитии туберкулезного инфекционного процесса, их титры и уровни были сравнимыми как при лечении изониазидом, так и Хиксозидом. Нежелательных реакций при их появлении не обнаружено на фоне достижения лечебного эффекта указанных препаратов.

### 5. Морфологическая оценка характера репаративных процессов в паренхиматозных органах в процессе лечения препаратом «Хиксозид» экспериментального туберкулеза у мышей.

Гистологические признаки специфического воспаления хорошо выражены в легких мышей через один месяц после аэрогенного заражения (контрольная группа). В верхних отделах легких вокруг бронхов и некоторых кровеносных сосудов появлялись характерные клеточные инфильтраты – пневмонические фокусы (рис. 12). Основу пневмонических фокусов составляли макрофаги с пенистой цитоплазмой (пенистые клетки – ПК), в которой концентрируется микобактерии. Пенистые макрофаги образовывали мелкие и более крупные скопления. Рядом с измененными ПК обычно можно видеть

1-3 полиморфноядерных лейкоцита (ПЯЛ) без признаков деструкции, а также лимфоциты. Последние располагались диффузно или формировали небольшие скопления вокруг мелких кровеносных сосудов, в т. ч. в зоне инфильтратов. Площадь воздушной легочной паренхимы в этот период наблюдения сокращена до 65-70%. В микроциркуляторной сети наблюдали полнокровие, выраженную агрегацию эритроцитов (т.н. *сладж*), выход отдельных клеточных элементов крови во внутриальвеолярное пространство.

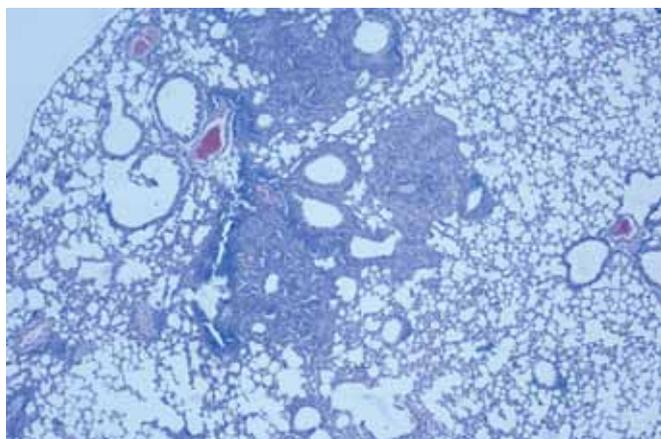


Рис. 12. Сокращение площади воздушной паренхимы, полнокровие сосудистой сети, агрегация эритроцитов в легких мышши контрольной группы через один месяц после аэрогенного заражения *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Окраска гематоксилином и эозином (× 125).

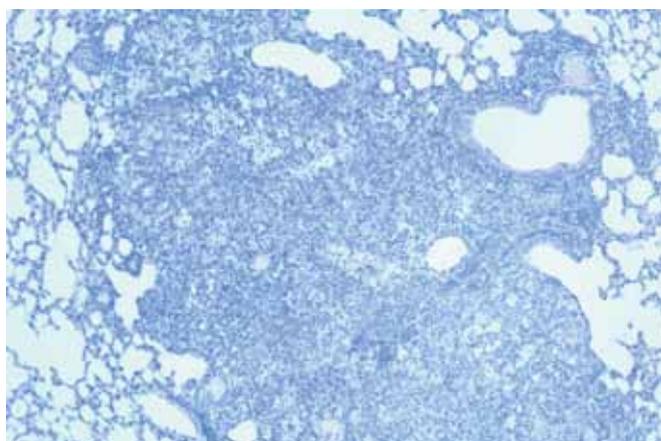


Рис. 13. Крупный пневмонический фокус, состоящий из перибронхиального и периваскулярных клеточных инфильтратов в легких мышши контрольной группы через 1,5 месяца после заражения *M.tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. Окраска гематоксилином и эозином (× 125).

Через 1,5 мес. (шестая неделя эксперимента) после заражения в контрольной группе специфический воспалительный процесс распространялся и на нижние отделы легких. Клеточные инфильтраты сливались между собой и занимали до 45-50% площади паренхимы (рис. 13). В эти сроки в группах мышей, получавших в течение двух недель изониазид или

Хиксозид, морфологическая картина специфического воспаления существенно не отличалась от описанной в контрольной группе.

У опытных мышей, получавших ингаляции лекарственных препаратов в течение четырех недель (восьмая неделя эксперимента), обращала на себя внимание положительная динамика туберкулезного воспаления, наиболее выраженная при применении Хиксозида. У этих мышей (рис. 14) воздушная легочная паренхима составляла не менее 55-60% (у получавших изониазид – 45-50%, в контрольной группе – не более 30-35%). При этом частота выявления ПК с просветленной цитоплазмой в большинстве инфильтратов заметно ниже, чем в контроле и у животных, получавших изониазид. В части инфильтратов преобладают лимфоциты, которые формировали более крупные, чем у мышей контрольной группы, плотные скопления вокруг мелких кровеносных сосудов.

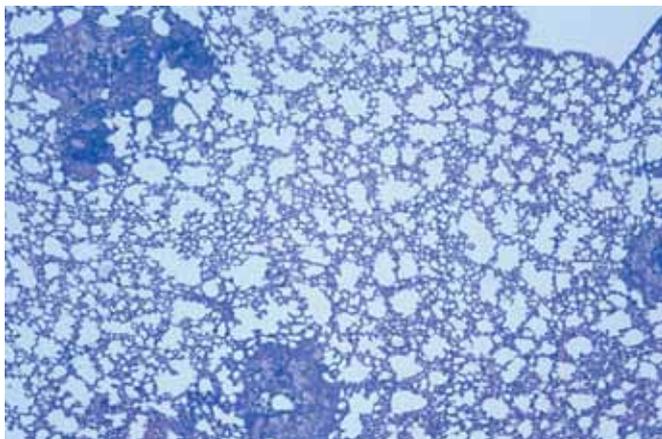


Рис. 14. Преобладание воздушной паренхимы в легких мыши, получавшей в течение четырех недель Хиксозид. Окраска гематоксилином и эозином (× 150).

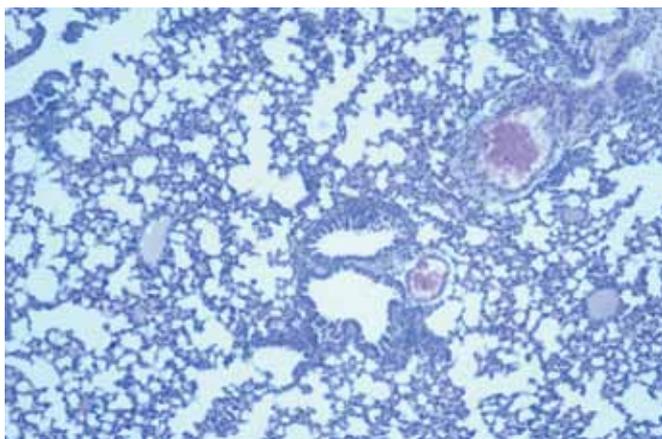


Рис. 15. Нормальная структура легочной паренхимы intactной мыши после ингаляции хиксозидом. Окраска гематоксилином и эозином (× 250).

Ингаляционное введение Хиксозида intactным (не зараженным) мышам не оказывало какого-либо заметного нежелательного влияния на структуру легочной паренхимы (рис. 15)

по сравнению с intactными мышами, получавшими ингаляции физиологического раствора. Лишь в отдельных, небольших участках легкого, у мышей обеих групп можно видеть некоторое повышение проницаемости воздушно-кровенного барьера для форменных элементов крови, главным образом эритроцитов, местами формировавших мелкие скопления во внутриальвеолярном пространстве.

Сравнительное изучение *in vivo* микробиологическими, иммунологическими и гистологическим методами противотуберкулезной активности препарата «Хиксозид» на модели экспериментального туберкулеза мышей при аэрогенном инфицировании позволило сделать ряд принципиальных выводов.

### Выводы

1. Краткосрочное (в течение месяца) лечение препаратом «Хиксозид» оказывает положительный эффект на течение туберкулезного процесса у мышей.
2. Препарат «Хиксозид» оказывает сочетанное действие на бактериальные клетки и обладает способностью к некоторому повреждению ДНК и белков, но не вызывает значимого окислительного стресса.
3. Развитие окислительного стресса и повышение протеолитической активности в клетках легких наблюдается при развитии заболевания, вызванного *M.tuberculosis*. Экспрессия в тканях пораженных органов белков SOD-2, BAX, AIF (в печени) коррелирует с интенсивностью окислительного стресса. Проявления патологии снимаются при использовании препарата «Хиксозид» и изониазида практически по всем параметрам.
4. Применяемые терапевтические концентрации препарата «Хиксозид» не оказывают токсического влияния на клетки моноцитарно-макрофагального ряда, цитотоксический эффект проявляется только в диапазоне достаточно высоких концентраций (400 мкг/мл).
5. Ингаляционное лечение препаратом «Хиксозид» инфицированных *M. tuberculosis* мышей к четвертой неделе приводит к более заметному и достоверному уменьшению количества КОЕ микобактерий в легком, по сравнению с мышами, получавшими изониазид.
6. Применение препарата «Хиксозид» в этих условиях способствует достоверному уменьшению доли макрофагов и нейтрофилов в легочной ткани зараженных мышей по сравнению с контролем, особенно через четыре недели лечения, увеличению процентного содержания CD4 лимфоцитов до нормы, снижению доли апоптотических клеток среди них, снижению количества CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> клеток и уровня продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, что коррелирует с уменьшением степени активности туберкулезного процесса.
7. Противолечательные антитела различных классов и подклассов иммуноглобулинов образуются в организме

животных только при наличии и развитии туберкулезного инфекционного процесса, их титры и уровни сравнимы при лечении как изониазидом, так и препаратом «Хиксозид». Нежелательных реакций при их появлении не обнаруживается на фоне достижения лечебного эффекта указанных препаратов.

8. Ингаляционное введение препарата «Хиксозид» интактным мышам не оказывает нежелательного влияния на

структуру легочной паренхимы по данным гистологического исследования, но демонстрирует более выраженное положительное влияние на динамику процессов заживления очагов специфического воспаления в легких и восстановления структурно-функциональных особенностей по сравнению с изониазидом.

.....

#### Литература

1. Манухов И. В., Котова В. Ю., Мальдов Д. Г. и др. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с цисплатиной // *Микробиология*. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 1–8.
2. Манухов И. В., Котова В.Ю., Завильгельский Г. Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // *Биотехнология*. – 2009. – № 6. – С. 16-25.
3. Отраслевые показатели противотуберкулезной работы в 2010-2011 гг. Статистические материалы и аналитический обзор основных показателей. – М.: ООО «Колор Медиа», 2013. – 48 с.
4. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G // *Immunochemistry*. – 1971. – Vol. 8. – N. 9. – P. 871-874.
5. Gadek J.E., Fells G.A., Zimmerman R.L., Crystal R.G. Role of connective tissue proteases in the pathogenesis of chronic inflammatory lung disease: review // *Environ. Health Perspect.* – 1984. – Vol. 55. – N. 4. – P. 297-306.
6. Global tuberculosis report 2012.- WHO (WHO/HTM/TB/ 2012.6). – 98 p.
7. Kapina M.A., Shepelkova G.S., Mischenko V.V. et al. CD27<sup>low</sup> CD4 T-lymphocytes that accumulate in the mouse lungs during mycobacterial infection differentiate from CD27<sup>high</sup> precursors in situ, produce IFN-gamma, and protect the host against tuberculosis infection // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – N. 2. – P. 976-985.
8. Lyadova I.V., Oberdorf S., Kapina M.A. et al. CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype // *Clin. exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 138. – N. 1. – P. 21-29.
9. Twining S. S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes // *Anal. Biochem.* – 1984. – Vol. 143. – N. 1. – P. 30–34.
10. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. Action of asymmetric 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // *Mutation Res.* – 2007. – Vol. 634. – N. 1-2. – P. 172-176.

#### Сведения об авторах

**Гергерт Владислав Яковлевич** – заведующий отделом иммунологии ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-72

e-mail: hergertv@yandex.ru

**Попова Ольга Александровна** – руководитель направления по туберкулезным препаратам ООО «Мир-Фарм», кандидат биологических наук

Адрес: 119435, г. Москва, Большой Саввинский пер., д. 12, стр. 16

Тел.: + 7 (495) 984-28-40, + 7 (495) 984-28-41

e-mail: oaropova@mirpharm.ru