На правах рукописи

ЗАХАРОВ АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ К ИЗОНИАЗИДУ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

14.01.16 – фтизиатрия

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор **Эргешов Атаджан Эргешович**

Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Хохлов Александр Леонидович**

Официальные оппоненты:

Стаханов Владимир Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фтизиатрии

Коломиец Владислав Михайлович, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рачина Светлана Александровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры внутренних болезней с курсом кардиологии и функциональной диагностики им. академика В.С. Моисеева ФГАОУ ВО «Российский Университет Дружбы Народов»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «8» октября 2019 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.052.01, созданного на базе ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», по адресу: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (107564, г.Москва, Яузская аллея, д.2; **http://critub.ru)**

Автореферат разослан «___»_____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук Юхименко Наталья Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

По данным ВОЗ туберкулёз занимает девятое место среди ведущих причин смертности на планете и является главной причиной смерти от какого-либо одного возбудителя инфекции. Ежегодно в мире от туберкулёза умирает около 1,5 миллионов человек, кроме этого более 300 тыс. случаев смерти регистрируются от туберкулёза на фоне инфицирования ВИЧ. Также ежегодно в мире заболевает туберкулёзом более 10 миллионов человек, в том числе, около1,5 миллионов – лица, инфицированные ВИЧ (WHO, 2018). Современная стратегия ВОЗ предусматривает переход от программы «Остановить туберкулёз» к программе «Ликвидировать туберкулёз» и ориентирует мировое сообщество на сокращение к 2035 г. по сравнению с 2015 г. смертности на 95%, заболеваемости – на 90%. Важным событием, определившим мировые приоритеты в борьбе с туберкулёзом, стала состоявшаяся в Москве 16-17 ноября 2017 г. Первая глобальная министерская конференция Всемирной организации здравоохранения «Остановить туберкулез в эпоху устойчивого развития: многосекторальный подход» и участие в работе форума Президента РФ.

Принятые в РФ за первое десятилетие XXI века меры позволили достигнуть стабилизации основных эпидемиологических показателей по туберкулёзу с тенденцией к их снижению. Заболеваемость с 2008 по 2017 г. снизилась с 85,1 до 48,3 на 100 тыс. населения (на 43,2%), смертность – с17,9 до 6,5 на 100 тыс. населения (на 63,7%) (О.Б. Нечаева, 2018). Вместе с тем, проблема туберкулёза в России и мире сохраняет актуальность. Это связано с развивающейся эпидемией ВИЧ-инфекции и ростом доли пациентов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя туберкулёза (С.А. Стерликов, О.Б. Нечаева, Д.А. Кучерявая и др., 2017, О.Б. Нечаева, 2018). Особую тревогу вызывает туберкулёз с МЛУ/ШЛУ-МБТ. Указанная проблема носит общемировой масштаб. По данным ВОЗ (2019), в 2018 году туберкулёзом с МЛУ возбудителя заболели более 500 тыс. человек, при этом, ещё 110 тыс. впервые заболевших имели устойчивость к рифампицину. По оценкам экспертов ВОЗ, не менее 10% пациентов с МЛУ-ТБ имеют ШЛУ-ТБ. Ежегодная статистика ВОЗ свидетельствует, что около 50% (в 2016г. – 47%) мирового потенциала МЛУ-ТБ приходится на Индию, Китай и Российскую Федерацию. По данным официальной статистики динамика больных с МЛУ-ТБ в 2015 - 2016 годах в РФ составила соответственно: среди впервые выявленных пациентов – 26,7%-27,3%, при рецидивах – 45,7%-47,6% (С.А.Стерликов, О.Б.Нечаева, Д.А.Кучерявая, 2017). В 2017 году доля МЛУ-ТБ среди всех больных с бактериовыделением увеличилась с 51,2 до 54,0% (О.Б.Нечаева, 2018). Эффективность химиотерапии МЛУ-ТБ в мировой когорте составляет в последние годы около 50% и 30% при ШЛУ-МБТ (WHO, 2019). Абациллирование больных с МЛУ-ТБ в 2017 году в РФ составило

28,7% на фоне абациллирования контингентов 51,5% и прекращения бактериовыделения – 70,7% (О.Б.Нечаева, 2018).

Химиотерапия остаётся основным методом лечения туберкулёза. Однако неэффективная химиотерапия приводит к селекции устойчивых штаммов возбудителя и формированию резистентного туберкулёза. Очевидно, что использование в стартовых режимах лечения агентов, подавляющих МБТ с природной устойчивостью к химиопрепаратам, значительно снижало бы риск формирования резистентного туберкулёза. Современная доктрина лечения туберкулёза базируется на экспресс тестировании молекулярно-генетическими методами ЛУ МБТ к основным химиопрепаратам - изониазиду и рифампицину с последующим выбором адекватного режима лечения. По данным И.А.Бурмистровой (2018) среди бактериовыделителей устойчивость к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину встречается у 12,1% больных. В отличие от рифампицина моноустойчивость к изониазиду не представляет серьёзной опасности. Однако полихимиорезистентность с фиксированной устойчивостью к изониазиду значительно осложняет прогноз заболевания. Устойчивость к изониазиду не только повышает риск формирования МЛУ-ТБ, но и является важнейшим фактором неблагоприятного отдалённого результата лечения (Ю.М. Маркелов, 2011; И.А. Васильева, А.Э. Эргешов, А.Г. Самойлова и др., 2012). Использование изониазида в программах превентивной химиотерапии, в том числе у ВИЧ-инфицированных больных, повышает актуальность изучения изониазид-резистентного туберкулёза. Отражением клинической значимости изониазида в схемах современного лечения туберкулёза является выделение в Федеральных клинических рекомендациях (2016) второго режима химиотерапии. В литературе содержится мало информации об особенностях течения и эффективности лечения туберкулёза лёгких с устойчивостью возбудителя к изониазиду. Не изучены спектры ЛУ МБТ, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду, и их дальнейшая динамика. Резистентность МБТ к изониазиду снижает эффективность превентивной химиотерапии, в том числе у больных ВИЧ-инфекцией. По данным А.М. Пантелеева (2017), устойчивость к изониазиду у впервые выявленных больных с сочетанной ВИЧ-инфекцией наблюдалась в 87,2%. Таким образом, устойчивость МБТ к изониазиду составляет отдельную проблему фтизиатрии и требует своего изучения и новых подходов к решению.

Внимание учёных во всем мире в последние годы привлекает антибактериальная активность наночастиц серебра (НЧС). Научными исследованиями установлено, что НЧС обладают повышенной реакционной и каталитической активностью, растворимостью, высоким адсорбционным потенциалом, а также способностью проникать через биологические барьеры организма и изменять их проницаемость для различных препаратов, в том числе, антибактериальной направленности (А.Л.Хохлов, Г.Н.Крейцберг, И.В. Завойстый и др., 2007, Е.М. Егорова, А.А.Кубатиев, В.И.Швец, 2014, 2017, A. Hebeish, M.H.El-Rafie, M.A. El-Sheikh et al., 2014, Franci G., Falanga A.,

Galdiero S. et al., 2015). Доказано выраженное антибактериальное действие НЧС на ЛУ штаммы различных возбудителей, а также их потенцирующее действие на антибактериальные препараты (S. Rajawat, M.S. Qureshi, 2012, T.C.Dakal, A.Kumar, R.S.Majudar et al., 2016). Указанные исследования явились предпосылкой для изучения НЧС с целью повышения эффективности химиотерапии туберкулёза.

Степень разработанности темы

В условиях роста ЛУ возбудителя туберкулёза возникает настоятельная необходимость изучения особенностей течения заболевания и факторов, влияющих на эффективность лечения у больных с различными спектрами резистентности МБТ. На фоне значительного количества работ в мировой и отечественной литературе по МЛУ/ШЛУ-туберкулёзу остаётся малоизученным вопрос туберкулёза с устойчивостью возбудителя к изониазиду и другим химиопрепаратам при сохранённой чувствительности к рифампицину. Несмотря на выделение в Федеральных клинических рекомендациях для данных больных 2 режима химиотерапии, в литературе недостаточно освещены вопросы особенностей клинического течения заболевания с данным спектром резистентности возбудителя, влияния устойчивости к изониазиду на эффективность лечения и риски формирования МЛУ/ШЛУ туберкулёза. Актуальность изучения данного вопроса повышает использование изониазида в режимах превентивного лечения, в том числе у больных с ВИЧ-инфекцией.

Применение в последние годы во фтизиатрии бедаквилина, линезолида, фторхинолонов и ряда других препаратов с противотуберкулёзной активностью позволило повысить результативность лечения больных с ЛУ возбудителя, однако это не решает проблему химиотерапии лекарственно-устойчивого туберкулёза. В этой связи в Федеральных клинических рекомендациях по диагностике и лечению туберкулёза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя (2015) отмечается необходимость научного поиска средств, потенцирующих действие противотуберкулёзных препаратов. В мировой и отечественной литературе содержатся результаты большого количества научных исследований, подтверждающих высокий антибактериальный потенциал наночастиц серебра на широкой спектр возбудителей, в том числе с лекарственной устойчивостью. Исследования по применения наночастиц серебра во фтизиатрии практически отсутствуют. Не изучена эффективность и токсичность совместного применения наночастиц серебра с химиопрепаратами в режимах длительного применения. В дебюте наших исследований мы не встретили работ по использованию наносеребра во фтизиатрии. В настоящее время имеются результаты немногочисленных исследований по данному вопросу (A. Banu, V. Rathod, 2013, К.М., Б.Б.Урасулова, А.О.Гюсан, 2017).

Цель исследования

Повышение эффективности лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохраненной чувствительности к рифампицину путем научного обоснования эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в эксперименте.

Задачи исследования

1. Изучить клинико-рентгенологические особенности туберкулёза лёгких при лекарственной устойчивости возбудителя к изониазиду в Ярославской области.
2. Оценить частоту формирования МЛУ-ТБ у больных с изначальной лекарственной устойчивостью МБТ к изониазиду.
3. Оценить эффективность лечения больных с лекарственной устойчивостью возбудителя к изониазиду в сравнении с МЛУ и туберкулёзом с сохранённой чувствительностью возбудителя в Ярославской области.
4. Изучить in vitro ингибирующую активность наночастиц серебра как монопрепарата и в комбинации с изониазидом на резистентные штаммы МБТ с расчетом минимальной ингибирующей и бактерицидной концентраций наночастиц. Определить характер повреждения МБТ при воздействии наночастиц серебра с использованием атомно-силового микроскопа.
5. Изучить in vitro противотуберкулёзную активность наночастиц серебра в обратных мицеллах против M. tuberculosis музейного штамма H37Rv и изониазид-резистентного штамма M. tuberculosis CN-40. Оценить характер взаимодействия наночастиц серебра с изониазидом и рифампицином.
6. Изучить in vivo токсические свойства наночастиц серебра, в том числе, в сочетании с изониазидом.
7. Изучить химиотерапевтическую эффективность наночастиц серебра и их комбинацию с изониазидом на модели экспериментального туберкулёза у животных.

Научная новизна исследования

1. Впервые изучены клинико-рентгенологические особенности туберкулёза лёгких с устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину и установлена частота формирования МЛУ туберкулёза у данного контингента больных в Ярославской области.
2. Впервые дана оценка эффективности лечения туберкулёза лёгких с устойчивостью МБТ к изониазиду в сравнении с МЛУ и лекарственно-чувствительным туберкулёзом в Ярославской области.

3. Впервые в эксперименте in vitro доказано бактерицидное действие наночастиц серебра на МБТ, включая лекарственно-устойчивые штаммы, и при этом определен характер повреждений возбудителя с использованием атомно-силовой микроскопии.
4. Впервые в эксперименте in vitro доказано значительное усиление противотуберкулёзной активности изониазида и рифампицина при их совместном использовании с наночастицами серебра.
5. Впервые в эксперименте in vivo доказана токсикологическая безопасность использования наночастиц серебра с изониазидом в режиме длительного применения.
6. Впервые in vivo на модели экспериментального туберкулёза у животных доказано повышение эффективности химиотерапии при использовании наночастиц серебра.
7. Впервые рассчитана эффективная лечебная доза наночастиц серебра в составе химиотерапии у животных, что позволяет экстраполировать её для человека при установленном уровне безопасности.
8. Получен патент на использование НЧС в качестве противотуберкулёзного средства, способного повышать противотуберкулёзную активность изониазида.

Теоретическая и практическая значимость

Проведённый анализ клинического течения туберкулёза лёгких с устойчивостью возбудителя к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину позволяет прогнозировать развитие заболевания и повышать эффективность его лечения.

Экспериментальное обоснование in vitro и in vivo эффективности и безопасности применения наночастиц серебра в лечении туберкулёза позволяет рекомендовать их для клинического исследования.

Научное обоснование альтернативного, физико-химического механизма противотуберкулёзного действия наночастиц серебра и доказанный синергизм их взаимодействия с химиопрепаратами целесообразно использовать как в стартовых режимах лечения с не уточнённой лекарственной устойчивостью, так и при установленной резистентности возбудителя.

Методология и методы исследования

В клинической части диссертации проведён ретроспективный анализ 650 историй болезни пациентов туберкулёзом лёгких с различными спектрами устойчивости возбудителя. В сравнении с лекарственно-чувствительным и МЛУ туберкулёзом дана оценка клинических особенностей течения и эффективности лечения бактериовыделителей с устойчивостью МБТ к изониазиду и другим препаратам при сохранённой чувствительности к рифампицину. Изучены спектры лекарственной устойчивости МБТ, ассоциированные с изониазидом, дана оценка рисков форми-

рования МЛУ/ШЛУ туберкулёза у больных с изониазид-ассоциированными спектрами устойчивости МБТ. В экспериментальной части исследования in vitro на модели 1350 клинических изолятов МБТ, полученных от больных, представленных в клиническом разделе диссертации, проведены исследования подавляющей активности наночастиц серебра. Изучена эффективность раздельного и сочетанного применения наночастиц и химиопрепаратов на чувствительные и резистентные штаммы возбудителя, определены минимальная ингибирующая и бактерицидная концентрации наночастиц. В эксперименте in vivo на крысах и мышах изучены токсические параметры наносоединений, в том числе в режиме длительного применения. С использованием атомно-силовой микроскопии изучены особенности повреждающего действия наночастиц на МБТ. На экспериментальной модели туберкулёза у имбредных мышей дана оценка химиотерапевтической эффективности применения наночастиц серебра и рассчитана эквивалентная лечебная доза наночастиц у человека. В ходе исследования применяли бактериологические, гистологические, иммунологические, лабораторные и другие методы исследования, включая атомно-силовую микроскопию. Статистическую обработку материала исследования проводили с использованием программы Microsoft Excel и статистической компьютерной программы «Биостатика», считая разницу показателей достоверной при вероятности 95% и более ($p<0,05$).

Основные положения, выносимые на защиту

1. При устойчивости МБТ к изониазиду и сохранённой чувствительности к рифампицину чаще наблюдался инфильтративный туберкулёз лёгких, при МЛУ-ТБ – фиброзно-кавернозный, при сохранённой чувствительности возбудителя одинаково часто встречались инфильтративный и диссеминированный туберкулёз. Фиброзные деструкции, резистентные к консервативной терапии, при устойчивости МБТ к изониазиду отмечались в два раза чаще в сравнении с лекарственно-чувствительным туберкулёзом.
2. При устойчивости МБТ к изониазиду у половины больных в течение 6-8 месяцев формируется МЛУ туберкулёз, при этом чаще наблюдаются сочетания HSE и HSEK.
3. Устойчивость возбудителя к изониазиду снижает показатели эффективности лечения по критериям абациллирования и закрытия полостей в сравнении с лекарственно-чувствительным туберкулёзом на 20%.
4. Наночастицы серебра оказывают выраженное бактерицидное действие in vitro как против музейного штамма M.tuberculosis $H_{37}Rv$, так и против клинических изолятов возбудителя с различными спектрами лекарственной устойчивости.
5. При сочетанном применении наночастиц серебра с изониазидом и рифампицином против M.tuberculosis H37Rv in vitro отмечается выраженное синергическое действие. Ингибирующая активность наночастиц с изониазидом in vitro против устойчивых к нему штам-

мов МБТ превосходит эффект изолированных наночастиц, при этом бактерицидные концентрации наночастиц находятся в диапазоне 2,5-10 мкг/мл.

6. По своим токсикологическим характеристикам наночастицы серебра могут быть отнесены к 4 классу опасности по ГОСТу 12.1.007 – 76 (малотоксичные), при этом они не повышают токсичность изониазида в режиме длительного применения.
7. Применение наночастиц серебра в сочетании с изониазидом на модели туберкулёза у мышей повышает выживаемость животных, обеспечивает лучшие показатели эффективности лечения и сопровождается отчетливыми положительными изменениями в гистологической картине воспаления.
8. Применение наночастиц серебра с альтернативным физико-химическим механизмом бактерицидного действия открывает новое направление в повышении эффективности лечения туберкулёза, в том числе, с лекарственной устойчивостью возбудителя.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Достоверность результатов исследования основывается на репрезентативности и достаточной выборке клинического материала (650 больных), высокой информативности и адекватности методов исследования, высокой валидности результатов, корректном проведении статистического анализа значимости выявленных изменений. Апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедр ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ: кафедры фтизиатрии, кафедры пропедевтики внутренних болезней, кафедры клинической фармакологии, кафедры поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии, кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией, кафедры патологической физиологии, кафедры медицинской физики с курсом медицинской информатики при участии врачей ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая туберкулёзная больница».

Основные положения диссертации были представлены в виде устных докладов и публикаций на съездах, международных и всероссийских конференциях, в том числе, на: XIX, XX и XXI Национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва, 2009, 2010, 2011); XVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2010); Научно-практической конференции «Актуальные вопросы фтизиатрии» (С-Петербург, 2010); Первом конгрессе национальной ассоциации фтизиатров (С-Петербург, 2011); IX съезде фтизиатров России (Москва, 2011); X съезде фтизиатров России (Воронеж, 2015); Научно-практической конференции «Инновационные технологии в организации фтизиатрической и пульмонологической помощи населению» (С-Петербург, 2011); Научно-практической конференции «Междисциплинарные аспекты дифференциальной диагностики и лечения туберкулёза» (Москва, 2012); заседаниях научно-медицинского общества фтизиатров Ярославской области (2010, 2013, 2016, 2017, 2018, 2019

г.г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Туберкулёз и сочетанные инфекции: вызовы и перспективы» (Москва, июнь 2017); V Ежегодной конференции московских фтизиатров «Профилактическая противотуберкулёзная работа в мегаполисе: объём, затраты, эффективность» (Москва, 14-15 сентября 2017 года); V съезде фармакологов России (14-18 мая 2018 года, г. Ярославль); Медицинском профессорском форуме «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении», 5-6 декабря 2018 года, Ярославль.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальностей научных работников: 14.01.16 – «фтизиатрия» и 14.03.06- фармакология, клиническая фармакология и областям исследования: пункты 2, 4 (14.01.16) и пункты 1, 5 (14.03.06).

Внедрение результатов исследования

Основные результаты исследования включены в программу преподавания на кафедрах фтизиатрии, клинической фармакологии, микробиологии с вирусологией и иммунологией ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ. Клинические положения диссертационной работы представлены на врачебных и научных конференциях и используются в работе врачами ГБУЗ ЯО «Ярославская областная клиническая туберкулёзная больница».

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования – постановке и формулировании цели и задач научной работы, планировании и непосредственном проведении клинических и экспериментальных исследований, проведении научного и статистического анализа полученных результатов, формулировке выводов и практических рекомендаций. Автор самостоятельно готовил и обсуждал в научных публикациях результаты научных исследований. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 42 печатных работы, в том числе, 14 работ в журналах, включённых в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий», рекомендуемых ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для опубликования основных научных результатов диссертации, из них 1, входящая в международные базы данных. Имеется патент на изобретение и монография в соавторстве по теме диссертации.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 255 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, 5 глав с изложением материалов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Указатель литературы содержит 437 наименования работ, в том числе 164 отечественных и 273 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 136 таблицами и 61 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы клинических исследований

Ретроспективно изучено 650 историй болезни ВИЧ-отрицательных больных с деструктивным туберкулёзом лёгких и бактериовыделением. Выделяли следующие группы больных: 1 группа – 214 больных с устойчивостью МБТ к изониазиду и другим препаратам при сохранённой чувствительности к рифампицину, 2 группа – 221 человек с МЛУ-ТБ, 3 группа – 215 больных с сохранённой чувствительностью возбудителя ко всем ХП. Выделяли следующие категории больных: 1) новые случаи химиотерапии у впервые выявленных или больных, получавших химиотерапию менее 1 месяца; 2) случаи повторного лечения, включающие повторное лечение у хронических больных, после неэффективного курса химиотерапии или после прерывания лечения; 3) лечение по поводу рецидива заболевания. Лечение больных проводилось в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями и приказом МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014 года. Мужчин было 531 (81,7%), женщин – 119 человек (18,3%). Наибольшее количество пациентов приходилось на возрастные категории: от 30 до 39 лет – 24,8%, от 40 до 49 лет – 27,1% и от 50 до 59 – 24,2%.

У больных 1 группы наблюдалось 15 различных спектров устойчивости МБТ, во 2 группе – 45 спектров. Было изучено 537 изолятов от больных 1 группы и 1291 изолят – от 2 группы.

Объём, кратность обследования и выбор режима химиотерапии определялись в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению туберкулёза и приказом МЗ РФ от 29.12.2014г. № 951. Оценка эффективности лечения проводилась у больных, которые в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями и выбранным режимом химиотерапии получили необходимое количество суточных доз химиопрепаратов. Основными критериями эффективности лечения являлись прекращение бактериовыделения (абациллирование) и заживление деструкций в лёгких (закрытие каверны). Из 214 больных 1 группы для оценки эффективности лечения были отобраны 149 больных, в том числе, впервые выявленных – 52, с повторным лечением – 82 и с рецидивом – 15 больных. Из 221 больного 2 группы эффективность химиотерапии оценивалась у 112 пациентов, в том числе, 18 – впервые выявленных, 78 – с повторным лечением и 16 - с рецидивом заболевания. Из 215 больных 3 группы было отобрано

152 больных, в том числе, 115 – впервые выявленных, 25 – с повторным лечением и 12 – с рецидивами.

При статистической обработке материала рассчитывали среднее значение показателя и величину средней ошибки. Статистическую достоверность показателей оценивали с помощью коэффициента достоверности Стьюдента, рассчитываемого по формуле: $t=M1-M2/\sqrt{m1^2+m2^2}$, считая разницу достоверной при вероятности 95% и более ($p<0,05$). Статистическую обработку проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 и статистической компьютерной программы «Биостатика».

Материал и методы экспериментальных исследований

В работе использовали водный раствор НЧС, который получали методом электрохимического растворения металла, при этом размер наночастиц составил 5 - 65 нм (Патент RU 2 390 344 C2, НПО «Ликом», Ярославль). Стабильность растворов НЧС сохранялась в течение 300 суток. Химическая экспертиза показала, что НЧС не изменяют концентрацию изониазида при смешивании в растворе. Также использовались НЧС, полученные методом биохимического синтеза в обратных мицеллах (ИФХЭ РАН им. А.Н.Фрумкина, Москва). Средний размер НЧС в обратных мицеллах находился в интервале 8-10 нм, концентрация - 1-0,8 mM и 2-1,6 mM.

Объём доклинических исследований в соответствии с действующими на момент выполнения научной работы нормативными документами определялся «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», 2005, приложением к Приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».

Изучение подавляющей активности нанопрепаратов на МБТ проводилось при следующих концентрациях НЧС –5; 25 и 50 мкг/мл. Концентрация изониазида во всех исследованиях составляла 1 мкг/мл. Исследования проводили на 117 клинических изолятах МБТ, полученных от больных 1 группы и 108 изолятах 2 группы. Спектры ЛУ МБТ от больных 1 группы содержали от 2 до 7 химиопрепаратов, от 2 группы – от 2 до 10. От впервые выявленных больных было выделено 52 изолята, с повторным лечением – 136, с рецидивами – 37. Проведено 1350 бактериологических исследований подавляющей активности наночастиц. Оценка результатов проводилась на основании подсчета количества колонии образующих единиц (КОЕ) МБТ на плотной питательной среде и сравнения контрольных и опытных посевов. При полном или значительном подавлении роста МБТ результат оценивали как бактерицидный, при умеренном – как бактериостатический.

В отделе иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» изучали активность НЧС в обратных мицеллах против M. tuberculosis музейного

штамма H37Rv и изониазид-резистентного штамма M. tuberculosis CN-40. Также изучали активность комбинированного применения НЧС(AgNp) с изониазидом (AgNp+INH) и рифампицином (AgNp +RIF) против указанных выше возбудителей. Тестирование противотуберкулезной активности соединений in vitro выполнялось либо в круглодонных пробирках (2 мл суспензии), либо в 96-луночных круглодонных планшетах (B.V.Nikonenko, A.Kornienko, K.Majorov et al., 2016). Рост МБТ оценивали по наличию видимого осадка на дне круглодонной лунки на 12-14 сутки после внесения соединений. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК 100%) выражалась в диапазоне концентраций тестируемого вещества, где верхняя граница диапазона – минимальная концентрация с отсутствием роста микобактерий, а нижняя граница - максимальная концентрация с ростом микобактерий. При изучении характера взаимодействия НЧС в обратных мицеллах с изониазидом и рифампицином определяли показатель фракционной ингибиторной концентрации (FIC) (V.M. Reddy, L.Einck, K.Andries et al., 2010) и фракционный ингибиторный индекс (ΣFIC)). При $\Sigma FIC \leq 0,5$ – взаимодействие оценивали как синергическое, при $\Sigma FIC \geq 4,0$ – анагонистическое, а значения между этими показателями указывали на аддитивное взаимодействие.

Определение минимальной подавляющей (МПК) и минимальной бактерицидной концентраций (МБК) проводилось в соответствии с протоколом Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева, 2005).

Подготовки образцов для атомно-силовой микроскопии (АСМ) заключалась в их иммобилизации на подложке из кварцевой слюды. Для оценки характера повреждающего действия проводили предварительную экспозицию микобактериальной суспензии с НЧС. Микобактерии просматривали в атомно-силовом микроскопе «Femto-Scan» производства НПП «Центр перспективных технологий» (Москва). Изображение обрабатывали с использованием программы «Femto-Scan» в лаборатории атомно-силовой микроскопии кафедры органической химии Ярославского государственного университета им П.Г.Демидова.

Токсикологическая оценка наночастиц серебра и нанокомпозита проводилось на белых нелинейных мышах и белых крысах обоего пола. После выведения животных из эксперимента в соответствии с нормами и документами, регламентирующими проведение научных исследований с использованием экспериментальных животных (Приказ МЗСР РФ от 23.08.2010 № 708 «Об утверждении Правил лабораторной практики»), производили забор кусочков заинтересованных органов и тканей. Для патоморфологического исследования изучаемые органы фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Изучалась острая, подострая, хроническая токсичность изолированных наночастиц и нанокомпозита. Также исследовалось кожно-резорбтивное, аллергогенное и иммунотоксическое

действие нанопрепаратов. Токсикологические исследования проводились в научно-исследовательской лаборатории кафедры патологической физиологии ГБОУВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ и лаборатории токсикологии НИИ «Ярсинтез», Ярославль.

Изучение химиотерапевтической эффективности нанопрепаратов проводилось в соответствии с рекомендациями Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева, 2005). В эксперименте участвовало 68 мышей-самцов имбредной линии BALB/c. При создании модели туберкулёза использовали двухнедельную вирулентную культуру клинического изолята *M. tuberculosis*, устойчивую к изониазиду, рифампицину и стрептомицину. Инфицирующая доза для одной мыши составляла $5x10^6$ КОЕ. Подопытных животных заражали внутривенно указанной выше дозой в область ретроорбитального синуса. Были сформированы следующие группы животных: контрольные группы: а) незаражённые животные – 5 животных; б) заражённые нелеченные – 10 животных; в) заражённые, леченные изониазидом в дозе 50 мг/кг массы (10 животных); опытные группы: 1 группа – инфицированные, леченные НЧС (20 животных), в том числе, 5 животных – в дозе 12,5 мкг/кг, 5 животных – в дозе 25 мкг/кг, 5 животных – в дозе 50 мкг/кг, 5 животных – в дозе 125 мкг/кг; 2 группа – инфицированные, леченные нанокомпозитом (НК) (20 животных) в дозе: по изониазиду доза в композите была универсальной и составляла 50 мг/кг, по наночастицам: 5 животных – в дозе 12,5 мкг/кг, 5 животных – в дозе 25 мкг/кг, 5 животных – в дозе 50 мкг/кг, 5 животных – в дозе 125 мкг/кг. Развитие генерализованного туберкулёза было подтверждено через 14 дней после инфицирования патоморфологическими исследованиями у 3 мышей. Лечение было начато через 14 дней после заражения и продолжалось до момента гибели всех заражённых нелеченных животных, что являлось условием окончания опыта. Изониазид, наночастицы и нанокомпозит вводили лабораторным животным внутримышечно ежедневно. Эффективность лечения определялась по следующим критериям: показатель выживаемости; динамика массы тела; индекс поражения паренхиматозных органов-мишеней (лёгкие, печень, почки, селезёнка); биометрические исследования (масса и коэффициент массы внутренних органов-мишеней); бактериоскопический показатель и индекс высеваемости МБТ из органов-мишеней. Определяли количество эритроцитов, лейкоцитов с лейкоцитарной формулой, тромбоцитов, ретикулоцитов, лимфоцитов, моноцитов. Патоморфологическое исследование органов-мишеней включало некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование. Индекс поражения органов рассчитывался по методике Г.Н.Першина в модификации А.Н.Тогуновой и предусматривал следующую градацию: **0** баллов – 1-3 мелких очага в лёгких; **1** балл – 4-10 мелких полупрозрачных очагов в лёгких при отсутствии видимой патологии в печени и селезёнке; **2** балла – 10-20 хорошо выраженных очагов в лёгочной ткани и единичные – в

печени и селезёнке; **3** балла – 20 и более крупных очагов в лёгких (до 0,5 см в диаметре), множественные очаги в печени и селезёнке; **4** балла – кавернозно-некротические поражения лёгких, кахексия, гибель животного. Коэффициент массы органа (КМО) рассчитывался путём деления массы органа на массу тела. Поскольку при прогрессировании туберкулёзного процесса на фоне усиленного катаболизма закономерно уменьшается масса тела, а воспалительные изменения приводят к увеличению массы поражённого органа, то при прогрессировании заболевания КМО увеличивается, а при выздоровлении – снижается. Установлено, что КМ лёгких отражает распространённость поражения, селезёнки – тяжесть течения инфекции и степень генерализации процесса, а печени – свидетельствует о степени интоксикации организма животного. Бактериоскопический показатель (БП) определяли, как среднее значение общего количества микобактерий на группу. Результат учитывали по четырёхбальной системе, предложенной Г.Н. Першиным: **0** баллов - от 1 КУМ в 100 полях зрения (п/з) до 10 КУМ в 10 полях зрения (п/з); **1** балл - от 1 КУМ в 10 п/з до 1 КУМ в 1 п/з; **2** балла – 2-10 КУМ в 1 п/з; **3** балла – 11-50 КУМ в 1 п/з; **4** балла – свыше 50 КУМ в 1 п/з. Индекс высеваемости (ИВ) микобактерий туберкулёза определяли, как среднее из общего количества колониеобразующих единиц на каждую группу. Интенсивность роста культуры определяли по четырёхбальной системе, предложенной Г.Н. Першиным: **0** баллов – 1-3 колонии на 1 косяке с плотной средой; **1** балл – 4-10 колоний; **2** балла – 11-30 колоний; **3** балла – 30-100 колоний; **4** балла – сплошной рост колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Туберкулёз лёгких с устойчивостью МБТ к изониазиду в сравнении с лекарственно-чувствительным и МЛУ туберкулёзом

Возраст и пол больных представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Возрастно-половой состав больных

Группы больных	**Всего больных**	**Пол**		**Возраст**				
		М	**Ж**	**17-29**	**30-39**	**40-49**	**50-59**	**60 и более**
1 группа	214	174	40	27	55	60	49	23
	100%	**81,3%**	**18,7%**	**12,6%**	**25,7%**	**28,0%**	**22,9%**	**10,7%**
2 группа	221	181	40	23	53	59	55	31
	100%	**81,9%**	**18,1%**	**10,4%**	**24,0%**	**26,7%**	**24,9%**	**14,0%**
3 группа	215	176	39	26	53	57	53	26
	100%	**81,9%**	**18,1%**	**12,1%**	**24,7%**	**26,5%**	**24,7%**	**12,1%**
Всего	650	531	119	76	161	176	157	80
	100%	81,7%	18,3%	11,7%	24,8%	27,1%	24,2%	12,3%
	100%	**81,6%**	**18,4%**	**11,5%**	**24,8%**	**27,4%**	**23,9%**	**12,4%**

Таким образом, больные разных групп были сопоставимы по возрастно-половым характеристикам. Преобладали мужчины в возрасте от 30 до 59 лет.

Категории больных разных групп в зависимости от сроков и длительности ранее проводимой химиотерапии представлены в табл.2.

Таблица 2 – Соотношение новых случаев, повторного лечения и рецидивов

Группы больных	Всего больных	Впервые выявленные	Повторное лечение	Рецидивы
1 группа	214	62	126	26
	100%	**29,0%**	**58,9%**	**12,1%**
2 группа	221	33	156	32
	100%	**14,9%**	**70,6%**	**14,5%**
3 группа	215	160	39	16
	100%	**74,4%**	**18,1%**	**7,40%**
Всего	650	255	321	74
	100%	**39,2%**	**49,4%**	**11,4%**

Как видно из таблицы, в группах с лекарственной устойчивостью возбудителя (1 и 2 группы) превалировали больные с повторным лечением, при сохранённой чувствительности МБТ (3 группа) достоверно больше было впервые выявленных пациентов.

В 1 группе достоверно чаще в сравнении со 2 группой наблюдался инфильтративный туберкулёз лёгких (48,6% и 23,1%, $p<0,05$), во 2 группе превалировал фиброзно-кавернозный туберкулёз (40,3% и 18,7%, $p<0,05$). У больных с сохранённой чувствительностью возбудителя (3 группа) чаще наблюдались инфильтративная и диссеминированная форма туберкулёза лёгких – 42,8% и 41,9% соответственно.

У больных 1 группы при устойчивости к изониазиду различные по объему поражения встречались сравнительно одинаково с некоторой тенденцией в сторону сегментарных и долевых локализаций – 29,0% и 25,7% соответственно. В 3 группе больных с сохранённой чувствительностью МБТ реже встречались распространённые процессы (целое лёгкое – 18,1%, оба лёгких – 8,8%), при относительно равном количестве сегментарных и долевых поражений – 34,0% и 39,1% соответственно. У больных 2 группы с МЛУ возбудителя двухсторонние поражения встречались достоверно чаще в сравнении с другими группами больных (54,8%, $p<0,05$). Фиброзно-кавернозный туберкулёз во 2 группе статистически чаще протекал с обширными поражениями, захватывающими оба лёгких (76,4%), при этом в 1 группе больных при фиброзно-кавернозном туберкулёзе двусторонние изменения наблюдались статистически реже – у 47,5% больных ($p<0,05$).

У больных 2 группы достоверно чаще в сравнении с другими группами наблюдались множественных деструкции и крупные полостные образования более 4 см в диаметре ($p<0,05$). Параметры деструкций у больных 1 группы приближались к показателям 3 группы, при этом, в 1 группе чаще встречались крупные деструкции более 4 см – 27,6% и 13,5% соответственно.

Во 2 группе достоверно чаще в сравнении с 1 и 3 группами преобладали фиброзные полости (p<0,05). Пневмониогенные деструкции, характерные для «свежих» процессов, чаще наблюдались в 1 и 3 группах – 37,9% и 48,4%, соответственно. Все деструкции при фиброзно-кавернозном туберкулёзе у больных 2 группы закономерно имели фиброзный характер. У 12,5% больных 1 группы и 30,0% 3 группы при фиброзно-кавернозном туберкулёзе полости расценивались как ригидные, что отражало меньшее развитие фиброза в перикавитарной зоне и давало перспективу на эффективность использования методов коллапсотерапии. Пневмониогенные деструкции при инфильтративном туберкулёзе у больных 1 и 3 групп наблюдались более чем в два раза чаще, чем во 2 группе – 54,8%, 66,3% и 25,5% соответственно (p<0,05). Суммированные показатели ригидных и фиброзных полостей у больных 1, 2 и 3 групп составили соответственно – 32,8%, 71,1% и 15,8%. Таким образом, потенциал эффективности консервативной терапии по критерию закрытия полостей в указанных группах больных может составлять около 65-70%, 25-30% и 75-80% соответственно.

Массивность бактериовыделения отражает активность туберкулёзных изменений и косвенно свидетельствует о высоком риске лекарственной устойчивости возбудителя. По данным метода посева массивное бактериовыделение отмечалось в 1 группе у 73,8% больных, во 2 – 89,1%, в 3 – у 46,6%. Спектры лекарственной устойчивости возбудителя в 1 и 2 группах представлены на рис. 3.

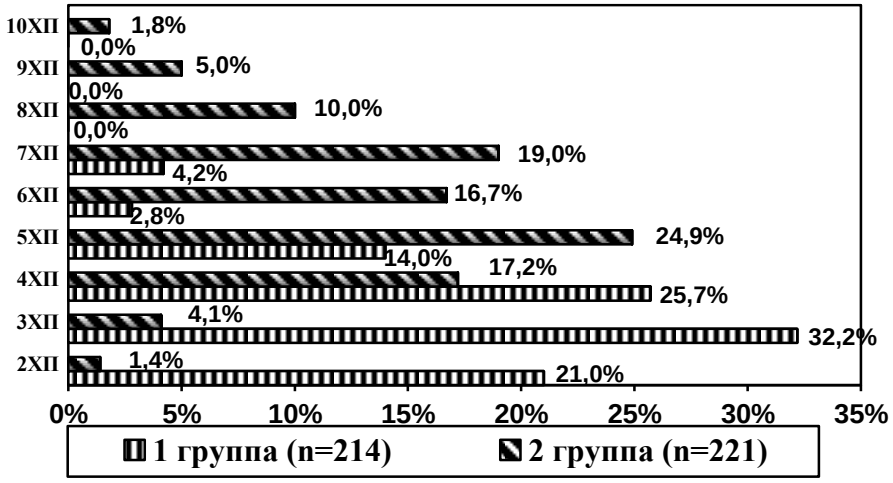
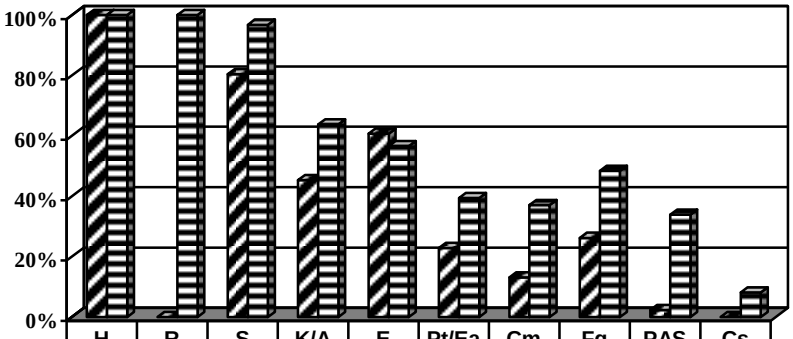


Рис. 3 – Спектры ЛУ возбудителя

Таким образом, спектры ЛУ МБТ у больных 2 группы были представлены более значительным количеством химиопрепаратов, при этом во 2 группе наиболее «длинный» спектр содержал 10 препаратов, в 1 – только 7. Среди отдельных спектров в 1 группе наиболее часто встречались HSE (11,2%) и HSEK (11,2%). Во 2 группе лидером был спектр HRSEK (7,7%).

Сравнительные показатели ЛУ МБТ к отдельным химиопрепаратам у больных 1 и 2 групп представлены в диаграмме на рис. 4. В 1 группе отмечается высокий уровень устойчивости воз-

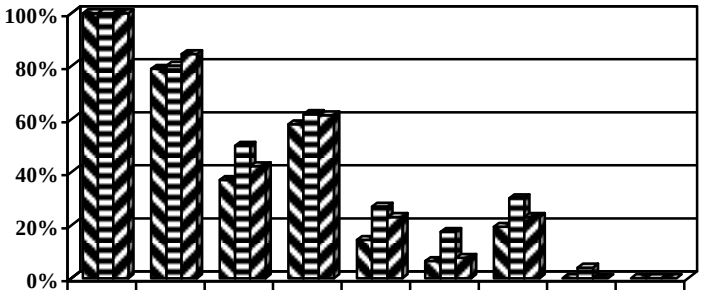
будителя к аминогликозидам (S-80,4%, K/A-45,3%), этамбутолу (60,7%) и фторхинолонам (26,2%). Несмотря на известную перекрестную устойчивость изониазида и протионамида, устойчивость к последнему составила лишь 22,9%. Устойчивость возбудителя во 2 группе имела статистически достоверные отличия от 1 группы по резервным препаратам (Pto, Cm, Fq, PAS, Cs - p<0,05). Резистентность МБТ к фторхинолонам у 48,4% и стрептомицину у 96,8% прогнозирует практически у половины больных 2 группы ШЛУ-МБТ.



	H	R	S	K/A	E	Pt/Ea	Cm	Fq	PAS	Cs
1 группа (n=214)	100%	0,0%	80,4%	45,3%	60,7%	22,9%	13,1%	26,2%	2,3%	0,0%
2 группа(n=221)	100%	100,0	96,8%	63,8%	56,6%	39,4%	37,1%	48,4%	33,9%	8,1%

Рис. 4 – Лекарственная устойчивость к отдельным ХП

Результаты устойчивости возбудителя к отдельным химиопрепаратам у больных разных категорий 1 группы представлены на рис. 5.

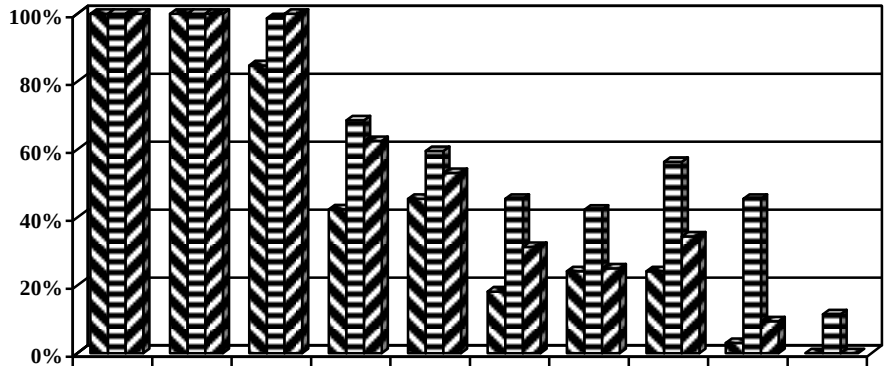


	H	S	K/A	E	Pt/Ea	Cm	Fq	PAS	Cs
в/выявленные	100%	79,0%	37,1%	58,1%	14,5%	6,5%	19,4%	0,0%	0,0%
повторное	100%	80,2%	50,0%	61,9%	27,0%	17,5%	30,2%	4,0%	0,0%
рецидивы	100%	84,6%	42,3%	61,5%	23,1%	7,7%	23,1%	0,0%	0,0%

Рис. 5 – ЛУ МБТ к отдельным ХП у больных 1 группы

Наиболее высокие показатели ЛУ в 1 группе, как видно из диаграммы, отмечались у больных с повторным лечением, однако, разница показателей не достоверна (p>0,05). Высокий уровень ЛУ наблюдался к этамбутолу (от 58,1% до 61,9%), фторхинолонам (от 19,4% до 30,2%). Стабильно высокие показатели ЛУ МБТ регистрировались во всех категориях к стрептомицину (от 79,0% до 84,6%).

Устойчивость МЛУ штаммов возбудителя к отдельным препаратам у больных разных категорий 2 группы показаны на рис. 6. Отмечается статистически значимый прирост устойчивости МБТ в сравнении с 1 группой у больных 2 группы с повторным лечением: к стрептомицину на 18,5% (p<0,05), канамицину – на 18,6% (p<0,05), протионамиду – на 18,5% (p<0,05), капреомицину – на 24,8% (p<0,05), фторхинолонам – на 26,2% , ПАСК – на 41,5% (p<0,05), циклосерину – на 11,5%.



	H	R	S	K/A	E	Pt/Ea	Cm	Fq	PAS	Cs
в/выявленные	100%	100%	84,8%	42,4%	45,5%	18,2%	24,2%	24,2%	3,0%	0,0%
повторное	100%	100%	98,7%	68,6%	59,6%	45,5%	42,3%	56,4%	45,5%	11,5%
рецидивы	100%	100%	100,0%	62,5%	53,1%	31,3%	25,0%	34,4%	9,4%	0,0%

Рис. 6 – ЛУ МБТ к отдельным ХП у больных 2 группы

У больных с ЛУ к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину достоверно чаще в последующем развивался МЛУ-ТБ. Так, при ретроспективном анализе спектров ЛУ возбудителя у 89 больных с МЛУ-ТБ было установлено, что у 48 из них (53,9%) в дебюте заболевания отмечалась ЛУ к изониазиду при сохранённой чувствительности к рифампицину, у 23 (25,9%) – изначально имелась МЛУ-МБТ и у 18 больных (20,2%) сохранялась чувствительность ко всем препаратам. Среди изониазид-ассоциированных спектров, трансформирующихся в дальнейшем в МЛУ, чаще наблюдались сочетания HSE (43,8%) и HSEK (35,4%).

Сравнительная эффективность лечения туберкулёза лёгких при устойчивости возбудителя к изониазиду

Эффективность лечения по критерию прекращения бактериовыделения (метод посева) представлена в диаграмме на рис. 7.

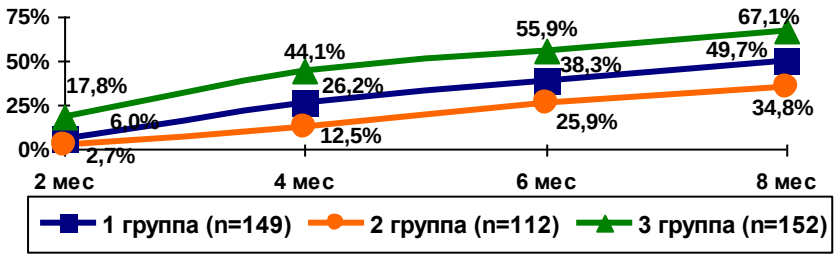


Рис. 7 – Динамика абациллирования больных по данным метода посева

Показатели эффективности бактериовыделителей с устойчивостью МБТ к изониазиду занимают промежуточное положение между МЛУ-ТБ и туберкулёзом с сохранённой чувствительностью возбудителя. Статистическая разница показателей к 8 месяцу химиотерапии между группами достоверна (p<0,05).

Эффективность лечения по критерию заживления деструкций лёгочной ткани показана в диаграмме на рис. 8.

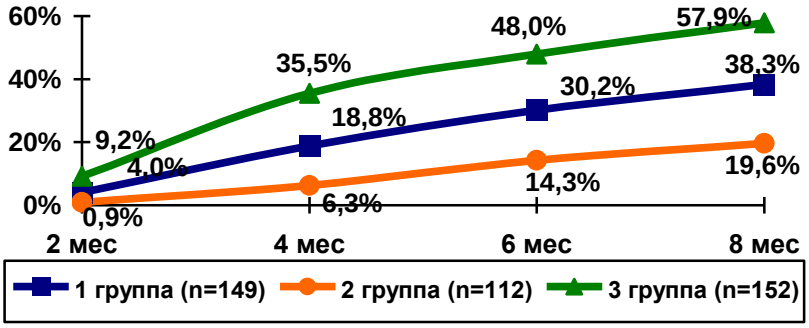


Рис. 8 – Динамика заживления деструкций лёгочной ткани

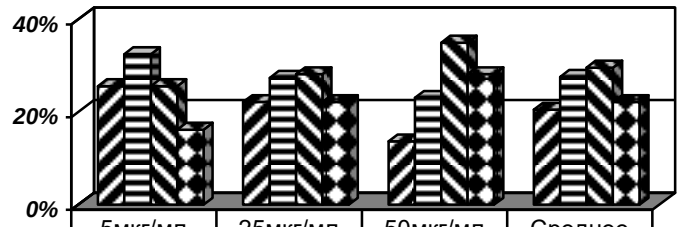
Показатели закрытия полостей у больных с устойчивостью МБТ к изониазиду также занимают промежуточное положение. Различия в показателях заживления полостей у больных разных групп статистически достоверны (p<0,05). Вместе с тем, показатели эффективности лечения бактериовыделителей с устойчивостью МБТ к изониазиду нельзя признать удовлетворительными. Как отмечалось выше, потенциал по закрытию полостей у этих больных составляет не менее 65-70%. Снижению эффективности лечения может способствовать развитие нежелательных, в том числе, неустранимых реакций при замене изониазида на менее эффективные и более токсичные препараты второго ряда. По нашим данным отмена химиопрепаратов по указанной выше причине отмечалась у 16,4% больных. Использование аминогликозидов, фторхинолонов и этамбутола во II режиме лечения при ЛУ МБТ у впервые выявленных больных при ЛУ МБТ к этим препаратам соответственно 37,1%, 19,4% и 58,1% повышает риск амплификации возбудителя, снижает эффективность лечения и ухудшает прогноз заболевания.

В условиях роста ЛУ МБТ, снижения эффективности лечения резистентного туберкулёза, часто ассоциированного с ВИЧ-инфекцией, чрезвычайно актуальным является поиск противотуберкулёзных агентов с альтернативным механизмом действия независимо от наличия и спектра ЛУ возбудителя. Нами предлагается использовать с этой целью в составе химиотерапии НЧС, показавших высокую эффективность против большого спектра нетуберкулёзных возбудителей, в том числе с лекарственной устойчивостью.

Ингибирующая активность изолированных наночастиц серебра

Из представленных на рис. 9 результатов видно, что бактерицидное действие (полное и значительное подавление роста возбудителя) изолированных НЧС на изоляты 1 группы наблю-

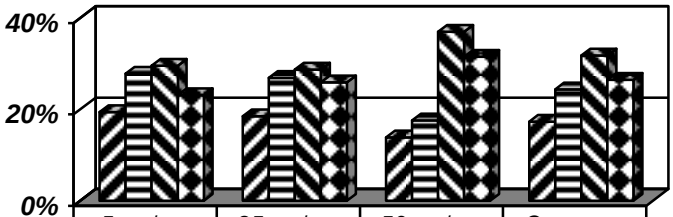
далось в 48,1% опытов(20,5+27,6%), бактериостатическое - в 29,6%. Максимальное подавляющее действие наблюдалось при концентрации наночастиц 5 мкг/мл.



	5мкг/мл	25мкг/мл	50мкг/мл	Среднее
полное	25,6%	22,2%	13,7%	20,5%
значительное	32,5%	27,4%	23,1%	27,6%
умеренное	25,6%	28,2%	35,0%	29,6%
отсутствует	16,2%	22,2%	28,2%	22,2%

Рис. 9 – Ингибирование роста НЧС изолятов МБТ от больных 1 группы (n=117)

Как следует из диаграммы на рис. 10, бактерицидное действие НЧС на изоляты 2 группы отмечалось в 41,7% случаев (17,3+24,4%), бактериостатическое – в 31,8%. Максимальная эффективность также наблюдалась при концентрации наночастиц 5 мкг/мл.



	5мкг/мл	25мкг/мл	50мкг/мл	Среднее
полное	19,4%	18,5%	13,9%	17,3%
значительное	27,8%	26,9%	17,6%	24,4%
умеренное	29,6%	28,7%	37,0%	31,8%
отсутствует	23,1%	25,9%	31,5%	26,5%

Рис. 10 – Ингибирование роста НЧС изолятов МБТ больных 2 группы (n=108)

Разница показателей подавляющей активности наночастиц на изоляты 1 и 2 групп не имеет статистического подтверждения, как по средним результатам, так и по отдельным концентрациям ($p>0,05$), что может свидетельствовать об альтернативном механизме противотуберкулёзного действия.

Ингибирующая активность наночастиц в сочетании с изониазидом

Использование НЧС в сочетании с изониазидом на изоляты 1 группы, как следует из данных, представленных на рис. 11, обеспечило прирост показателя полного подавления роста в сравнении с изолированными наночастицами на 20,0% ($p<0,05$). В целом, прирост бактерицидного действия нанокомпозита по сравнению с применением наночастиц в изолированном режи-

ме составил 17,2% (p<0,05). Максимальная эффективность подавления роста наблюдалась при концентрации наночастиц 5 мкг/мл, при этом, бактерицидный эффект составил 73,1%, что на 15,0% больше показатели изолированных наночастиц (p<0,05).

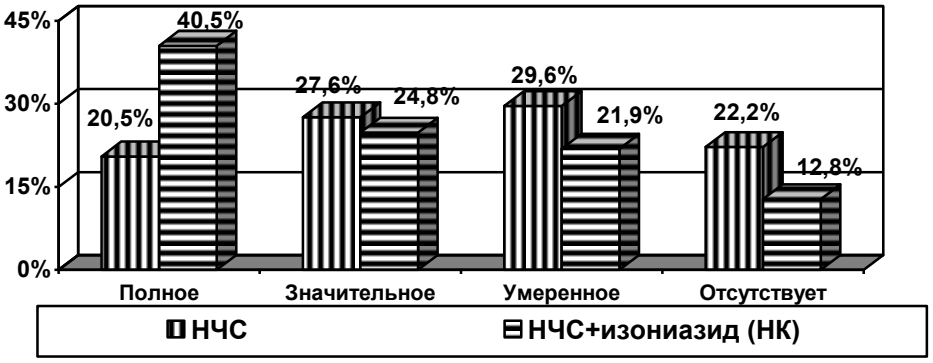


Рис. 11 – Ингибирование роста изолятов МБТ 1 группы (n=117) НЧС и НК

Результаты применения нанокомпозита на изоляты 2 группы представлены на рис. 12.

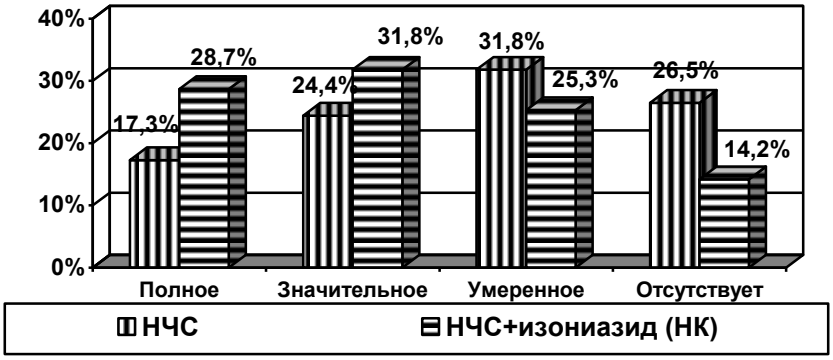


Рис. 12 – Ингибирование роста изолятов МБТ 2 группы (n=108) НЧС и НК

Как следует из данных на рис. 12, по критерию полного подавления роста разница показателей не имеет статистического подтверждения (p>0,05). Вместе с тем, бактерицидное действие нанокомпозита статистически достоверно превышает аналогичный показатель изолированных наночастиц (p<0,05). Прирост бактерицидного действия нанокомпозита на изоляты 2 группы по сравнению с изолированными наночастицами составил 18,8% (p<0,05). Максимальное бактерицидное действие отмечалось при концентрации наночастиц 5 мкг/мл.

Определение минимальной подавляющей (МПК)
и минимальной бактерицидной концентраций (МБК) наночастиц

МПК изолированных наночастиц на клинический изолят МБТ с ЛУ к HRS составила 5 мкг/мл, в сочетании с изониазидом – 2,5 мкг/мл. МБК изолированных наночастиц была зафиксирована на уровне 10 мкг/мл, в сочетании с изониазидом - 5 мкг/мл. Для сравнения, по данным

исследования A. Banu, V. Rathod (2013) МПК наночастиц серебра для лекарственно-устойчивых штаммов МБТ находилась в диапазоне 6,25-12,5 мкг/мл.

Противотуберкулёзная активность наночастиц серебра в обратных мицеллах против M. tuberculosis H37Rv и M. tuberculosis CN-40

В табл. 3 приводятся результаты тестирования наночастиц в монорежиме против M. tuberculosis музейного штамма H37Rv.

Таблица 3 – Ингибирование M. tuberculosis H37Rv наночастицами серебра

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	
НС(µl)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0	
Mtb (мл)	2	2	2	2	2	2	2	2 Дюбо
Визуальное наблюдение	чисто	чисто	чисто	чисто	чисто	чисто	мутность	чисто

Как следует из приведённой выше таблицы, все разведения НЧС в обратных мицеллах активно предотвращают рост МБТ, что говорит об их высокой бактерицидной активности.

В табл. 4 представлены результаты ингибирования музейного штамма M. tuberculosis H37Rv в 96-луночном круглодонном микроплейте комбинацией НЧС и изониазида.

Таблица 4 – Ингибирование M. tuberculosis H37Rv наночастицами в сочетании с изониазидом

	НС (разведения от исходного)						
INH (мкг/мл)		0	0,03	0,06	0,12	0,25	
	0	+	+	+	–	–	
	0,01	+	+	–	–	–	
	0,02	+	+	–	–	–	
	0,05	+	–	–	–	–	
	0,1	–	–	–	–	–	
	0,5	–	–	–	–	–	

«+» - рост МБТ H37Rv , «–» отсутствие роста МБТ H37Rv

Расчеты показывают: МИК INH = 0,1; МИК INH+AgNp = 0,01. FIC INH = 0,01/0,1 = 0,1. МИК AgNp = 0,12, МИК AgNp + INH = 0,03, FIC AgNp = 0,03/0,12=0,25. ΣFIC= 0,1+0,25=0,35, что означает синергическое взаимодействие изониазида и наночастиц серебра в обратных мицеллах против музейного штамма M. tuberculosis H37Rv.

В табл. 5 представлены результаты подавления роста музейного штамма M. tuberculosis H37Rv в 96-луночном круглодонном микроплейте комбинацией НЧС в обратных мицеллах и рифампицина.

Таблица 5 – Ингибирование M. tuberculosis H37Rv наночастицами в сочетании с рифампицином

		RIF (мкг/мл)					
AgNp (разведения от исходного)		1-0	2-0.004	3-0.008	4-0.016	5-0.032	6-0.64
	A-0	+	+	+	+	–	
	B-0.03	+	+	+	–	–	
	C-0.06	+	+	–	–	–	
	D-0.12	+	–	–	–	–	
	E-0.25	–	–	–	–	–	
	F-0.5	–	–	–	–	–	

«+» - рост МБТ H37Rv , «–» отсутствие роста МБТ H37Rv

Полученные результаты показывают, что МИК RIF = 0,032, МИК RIF+AgNp = 0,004, FIC RIF = 0,004/0,032=0,125. Для наночастиц серебра МИК AgNp= 0,25, МИК AgNp+ = 0.03, FIC=0.03:0.25=0.12. ΣFIC=0.125+0.12=0.245 – означает синергическое взаимодействие. Таким образом, наночастицы серебра с изониазидом и рифампицином проявляют выраженное синергическое взаимодействие против музейного штамма M. tuberculosis H37Rv .

Оценка результатов взаимодействия наночастиц с изониазидом против INH-резистентного штамма M. tuberculosis CN-40 показала, что FIC INH = 5/5 = 1; FIC AgNp = 1:800 / 1:800 = 1; ∑ FII 1 + 1 = 2, что свидетельствует об аддитивном взаимодействии наночастиц серебра в обратных мицеллах и изониазидом на резистентный к изониазиду штамм возбудителя CN-40.

Атомно-силовая микроскопия МБТ после воздействия НЧС

Исследовано 25 образцов МЛУ-МБТ, в том числе – 5 образцов обрабатывали изониазидом в концентрации 1 мкг/мл, 10 образцов – изолированными НЧС в концентрации 10 мкг/мл и 10 образцов – нанокомпозитом (НК) в концентрациях: по изониазиду – 1 мкг/мл, по НЧС– 5 мкг/мл. Обработка МБТ изониазидом в монорежиме и изолированными НЧС не приводила к визуальным изменениям морфологии возбудителя. Сочетанное воздействие наночастиц и изониазида сопровождалось формированием продольного вдавления клеточной оболочки с формированием М-образного поперечного профиля микобактерии. Аналогичные изменения, используя сканирующий туннельный микроскоп, наблюдали S.Agnihotri, S.Mukherji, S.Mukherji (2014), изучая влияния НЧС на бактериальные агенты. По мнению авторов, происходящие изменения могут нарушать осморегуляцию бактерии и приводить к экструзии внутриклеточного материала с последующей гибелью клетки. Морщинистая клеточная стенка, как считают авторы, может указывать на утечку содержимого цитоплазмы за пределы бактериальной клетки.

Изучение безопасного применения нанопрепаратов

Проводилась токсикологическая оценка изолированных НЧС и наночастиц в сочетании с изониазидом. В обоих случаях протокол и объём исследований был аналогичным. В автореферате приводятся результаты токсикологической оценки нанокомпозита, как потенциально более токсичного препарата.

Острая токсичность нанокомпозита.

При введении в желудок тестировались следующие дозы изониазида – 150, 200, 250 и 300 мг/кг. Доза НЧС была для всех концентраций изониазида стандартной и составила 5000 мкг/кг. Каждая группа состояла из 6 животных, всего 24 белых мыши и 24 крысы. LD_{50} изучаемого НК (по изониазиду) при однократном внутрижелудочном введении составила 250 мг/кг для крысы и 300 мг/кг для мыши. Таким образом, наночастицы не повышают уровень токсичности химиопрепарата в остром опыте. **При внутрибрюшинном и внутривенном введении** тестировались следующие дозы изониазида – 50, 150, 200 и 250 мг/кг при дозе НЧС 5000 мкг/кг. В оценке каждой дозы участвовало по 6 белых мышей и крыс при внутрибрюшинной затравке и по 6 крыс при внутривенной. При внутрибрюшинном введении LD_{50} НК (по изониазиду) для крыс составило 200 мг/кг, для мышей находилась в интервале 200-250 мг/кг. LD_{50} НК (по изониазиду) при внутривенной затравке составила 200 мг/кг массы крысы. **Накожное применение нанокомпозита** в дозах: по изониазиду – 250 мг/кг, по НЧС – 1000 мкг/кг показало, что LD_{50} накожной токсичности НК составляет более 250 мг/кг (по изониазиду) и соответствует 4 классу опасности (малоопасные).

Подострая токсичность изучалась на протяжении 30 дней при внутримышечном введении крысам НК в дозах по наночастицам 50, 250 и 500 мкг/кг и изониазида в постоянной дозе 50 мг/кг массы животного. В каждой группе было по 6 крыс-самцов и 6 крыс – в контрольной группе. Гибели животных не отмечалось. Основные физиологические параметры и лабораторные константы оставались в норме. Различия в динамике массы тела между животными экспериментальной и контрольной групп не носили статистической значимости. В опытных группах отмечалось преходящее повышение показателей трансаминаз в 2,5-3 раза.

Хроническая токсичность НК при внутримышечном введении изучалась на протяжении 7 месяцев в дозах по НЧС – 50, 250 и 500 мкг/кг, по изониазиду – 25 мг/кг. В эксперименте участвовали по 6 крыс-самцов и 6 – самок в каждой группе и по 6 разнополых крыс в контрольных группах. Гибели животных не наблюдалось. Общее состояние подопытных крыс не отличалось от животных контрольных групп. Показатели гемограммы наблюдаемых крыс находились в пределах физиологической нормы и достоверно не отличались от показателей контрольной группы. Отмечалось увеличение количества лимфоцитов при использовании НК с содержанием НЧС в концентрации 50 мкг/кг, что не исключает эффект иммуностимуляции.

Кожно-резорбтивное действие изучали на 10 белых мышах и 10 белых крысах путём погружения хвоста в исследуемые растворы, в том числе по 5 животных – контрольные группы. Гибели животных на протяжении двух недель после опыта не наблюдалось. Статистически значимых отклонений в прибавке массы тела и показателей коэффициентов массы внутренних органов опытных крыс по сравнению с контрольной группой не отмечалось.

Изучение **аллергогенного действия** не выявило сенсибилизирующих свойств НК.

Как показали **иммунотоксические исследования,** нанокомпозит не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность клеточных элементов органов иммунной системы (селезёнка, тимус, лимфатические узлы, костный мозг). На малые дозы НЧС в составе композита наблюдалась тенденция некоторого увеличение клеточности изучаемых органов, что не исключает иммуностимулирующих свойств наночастиц в малых концентрациях. Оценка влияния НК на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей не выявила значимых изменений показателя иммунной реактивности, что свидетельствует об отсутствии иммунотоксического действия нанокомпозита.

Гистологическая оценка токсичности нанокомпозита. Макроскопическая оценка внутренних органов крыс при хронической 7 месячной внутримышечной затравке НК (наночастицы – 500 мкг/кг, изониазид – 25мг/кг) не выявила особенностей. Гистологическому исследованию были подвергнуты сердце, печень, почки, лёгкие и головной мозг, а также мышечная ткань в месте введения нанокомпозита. Изменений гистологической структуры сердца, печени, почек, лёгких, головного мозга, а также мышечной ткани в местах введения НК выявлено не было. Проведённый анализ полиорганных признаков интоксикации полуколичественным методом по Г.Г. Автандилову также не выявил статистически значимых отклонений в сравнении с контрольными животными.

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОДЕЛИ ТУБЕРКУЛЁЗА У ЖИВОТНЫХ

Выживаемость мышей в группах представлена на рис. 13.

Из диаграммы следует, что максимальная выживаемость наблюдалась при лечении НК. Следует отметить, что при дозах наночастиц 12,5 и 25 мкг/кг наблюдалось 100% выживание мышей к моменту окончания эксперимента.

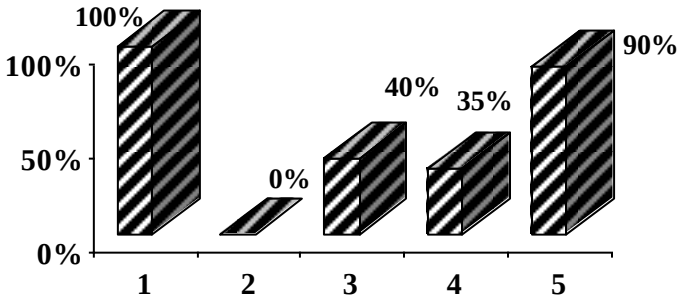


Рис. 13. Индекс выживаемости мышей
(кол-во выживших мышей к моменту гибели всех животных 2 группы)
1-контроль, не инфицированные (n=5); **2**-без лечения (n=10); **3**-изониазид (n=10);
4-наночастицы (n=20); **5**-нанокомпозит(n=20)

Результаты биометрических показателей экспериментальных животных представлены в табл. 6.

Таблица 6 – Результаты биометрических исследований

№ гр.	Условия опыта	Индекс поражения	Коэффициент массы лёгких	Коэффициент массы селез-ки	Коэффициент массы печени
1.	**Без лечения**	**2,7±0,67**	**6,11±0,65**	**4,04±0,35**	**10,03±0,66**
2.	**Изониазид 50 мг/кг**	**2,0±0,82**	**4,36±0,45** P1-2 <0,05	**2,68±0,41** P1-2 <0,05	**7,22±0,42** P1-2 <0,05
3.	**Наночастицы серебра**	**1,95±0,69** P1-3 <0,05	**5,0±0,79** P1-3 <0,05	**3,03±0,28** P1-3 <0,05	**7,62±0,47** P1-3 <0,05
4.	**Нанокомпозит**	**0,6±0,68** P1-4 <0,001 P2-4 <0,001 P3-4 <0,001	**2,71±0,24** P1-4 <0,001 P2-4 <0,001 P3-4 <0,001	**2,2±0,19** P1-4 <0,001 P3-4 <0,05	**6,61±0,33** P1-4 <0,001 P3-4 <0,05

Как следует из табл. 6, наиболее оптимальные биометрические показатели наблюдались при лечении НК.

Результаты микробиологических исследований органов-мишеней (показатели бактериоскопии и высеваемости из лёгочной ткани) представлены на рис. 14.

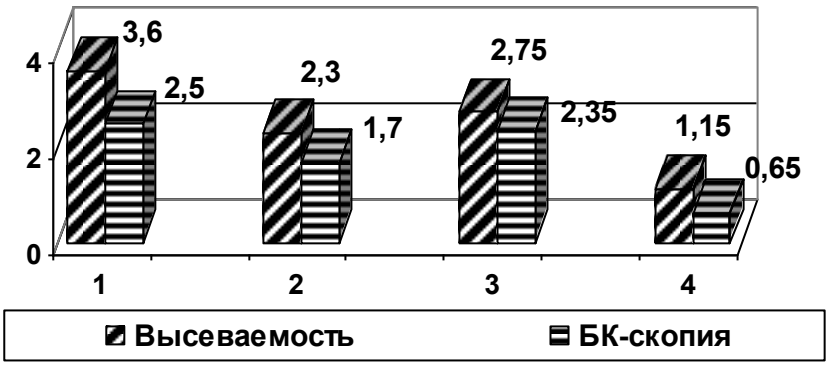


Рис. 14. Индексы бактериоскопии (ИБ) и высеваемости (ИВ) из лёгких (у.е.)

1-без лечения; **2**-изониазидом; **3**-наночастицами; **4**-нанокомпозитом

Из представленных результатов следует, что наименьший бактериоскопический показатель и индекс высеваемости возбудителя наблюдались при использовании в лечении НК, при этом разница показателей имела статистическую значимость ($p<0,05$). Максимальная эффективность отмечалась при дозе наночастиц 25 мкг/кг массы животного (ИВ= 0,6±0,55 ус.ед.). Результаты микробиологических исследований экстраторакальных органов (печень, почки, селезёнка) также подтвердили приоритет в лечении нанокомпозита.

Патоморфологическому исследованию подвергались как погибшие в ходе исследования, так и выжившие животные. Изучалась гистологическая структура лёгких, печени, почек и селезёнки мышей. Наиболее выраженные изменения наблюдались в лёгких. Характер тканевых реакций лёгочной ткани при различных методах лечения представлен в табл. 7.

Таблица 7 – Характер и распространённость специфического поражения лёгочной ткани

Группа	Сливной характер инфильтрации	Очаговый характер инфильтрации	Снижение воздушности	Множественные гранулёмы	Отдельные гранулёмы
Здоровые n=5	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствуют	Отсутствуют
Без лечения n=10	9 (90%)	1 (10%)	10 (100%)	Отсутствует	Отсутствуют
Изониазид n=10	6 (60%)	4 (40%)	6 (60%)	Отсутствуют	3 (30%)
Наночастицы n=20	12 (60%)	8 (40%)	15 (75%)	Отсутствуют	6 (30%)
Нанокомпозит n=20	4 (20%)	6 (30%)	6 (30%)	9 (45%)	7 (35%)

Как следует из табл. 7, в меньшей степени эксудативно-альтеративные изменения, связанные с прогрессирование туберкулёзного воспаления, наблюдались при лечении нанокомпози-

том. В этой же группе животных чаще отмечались признаки продуктивного типа воспаления, что свидетельствует о большей эффективности НК в сравнении с другими методами лечения. О благоприятном течении воспалительного процесса при сочетанном применении НЧС с изониазидом свидетельствует и клеточный состав инфильтратов и гранулём (табл. 8).

Таблица 8 – Клеточный состав инфильтратов и гранулём

Группа	**Единичные нейтрофилы**	**Скопления нейтрофилов**	**Скопления эпителиоидных клеток**	**Лимфоидные гранулёмы**	**Эпителиоидные гранулёмы**
Здоровые n=5	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют
Без лечения n=10	1 (10%)	9 (90%)	4 (40%)	Отсутствуют	Отсутствуют
Изониазид n=10	6 (60%)	4 (40%)	6 (60%)	2 (20%)	1 (10%)
Наночастицы n=20	14 (70%)	6 (30%)	8 (40%)	4 (20%)	2 (20%)
Нанокомпозит n=20	2 (10%)	Отсутствуют	2 (10%)	5 (25%)	11 (55%)

При использовании НК, как видно из табл. 8, нарастает количество гранулём лимфоидного и особенно эпителиоидного состава, что отражает преимущественно продуктивный тип тканевой реакции и свидетельствует о положительной динамике течения воспалительного процесса. С другой стороны, количество нейтрофильных гранулоцитов, ассоциированное с альтеративным воспалением и прогрессированием туберкулёзного процесса, значительно снижается. Таким образом, гистологические исследования подтверждают эффективность и приоритет в лечении экспериментального ЛУ туберкулёза сочетанного применения НЧС с изониазидом.

ВЫВОДЫ

1. При устойчивости МБТ к изониазиду чаще наблюдался инфильтративный туберкулёз лёгких – 48,6%, при МЛУ-ТБ – фиброзно-кавернозный туберкулёз (40,3%), при сохранённой чувствительности возбудителя одинаково часто встречались инфильтративный и диссеминированный туберкулёз (42,8% и 41,9% соответственно). Деструкции, не имеющие перспективы при консервативной терапии, отмечались у 32,8%, 71,1% и 15,8% соответственно вышеизложенной последовательности.

2. При изначальной устойчивости к изониазиду у 48 больных из 89 (53,9%) в течение 6-8 месяцев развивается МЛУ туберкулёз, при этом чаще наблюдаются сочетания HSE (43,8%) и HSEK (35,4%).
3. Показатель абациллирования к 8 месяцам лечения составил в Ярославской области: при устойчивости МБТ к изониазиду – 49,7%, при МЛУ-МБТ – 34,8%, при лекарственно-чувствительном туберкулёзе – 67,1%. Эффективность лечения по критерию закрытия полостей составила 38,3%, 19,6% и 57,9% соответственно.
4. По данным бактериологических исследований ингибирующая активность НЧС как монопрепарата составляет 77,7%, в сочетании с изониазидом – 87,2% ($p>0,05$). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) изолированных наночастиц составляет 5 мкг/мл, в сочетании с изониазидом – 2,5 мкг/мл. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) составила 10 мкг/мл, в сочетании с изониазидом – 5 мкг/мл. По данным атомно-силовой микроскопии ингибирование МБТ наночастицами серебра сопровождается повреждением клеточной стенки.
5. Наночастицы серебра в обратных мицеллах in vitro проявляют выраженное бактерицидное действие как на штаммы МБТ с сохранённой чувствительностью (M. tuberculosis H37Rv), так и на резистентные штаммы (M. tuberculosis CN-40). Сочетанное применение наночастиц серебра против M. tuberculosis H37Rv как с изониазидом, так и с рифампицином обнаруживает выраженное синергическое взаимодействие. При сочетанном применении НЧС в обратных мицеллах с изониазидом in vitro против M. tuberculosis CN-40 отмечалось аддитивное взаимодействие.
6. Наночастицы серебра в дозе 500 мкг/кг в режиме длительного применения не оказывали токсического влияния на экспериментальных животных и могут быть отнесены к 4 классу опасности (малоопасные) по ГОСТ 12.1.007-76. Наночастицы также не повышают токсические параметры изониазида при совместном применении.
7. Применение наночастиц серебра в сочетании с изониазидом обеспечило выживание к окончанию эксперимента 18 мышей из 20 (90%), при лечении изониазидом выжили 4 животных из 10 (40%), при монотерапии наночастицами – 7 из 20 (35%). Сочетанное применение наночастиц с изониазидом сопровождалось более быстрым уменьшением зон воспалительных изменений, преобладанием макрофагально-эпителиоидных клеточных элементов, свидетельствующих о положительной динамике процесса.

Практические рекомендации

1. Научно обоснованная в экспериментах in vitro и in vivo эффективность и безопасность применения наночастиц серебра в лечении туберкулёза позволяет рекомендовать их для клинического исследования.
2. Научно обоснованные в эксперименте высокие бактерицидные противотуберкулёзные свойства наночастиц серебра и выраженный синергизм их взаимодействия с химиопрепаратами позволяют рекомендовать применение наночастиц как в стартовых режимах лечения с не уточнённой лекарственной устойчивостью МБТ, так и при установленной резистентности возбудителя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Новые направления создания химиопрепаратов на основе нанотехнологий для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза (Поисковое исследование). / А.В.Павлов, Б.С.Кибрик, А.В.Захаров и др. //Актуальные вопросы медицинской науки: сбор. науч. работ сотруд. Ярославской гос. мед. акад., посв. 65-летию ЯГМА. – Ярославль, 2009. – с. 269 – 270.
2. Оценка параметров острой токсичности противотуберкулёзного нанокомпозита на основе наночастиц серебра для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг и др. // XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2009. – С. 290.
3. Изучение подострой токсичности противотуберкулёзного нанокомпозита для лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью МБТ на основе наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг и др.// XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2009. – С. 289 – 290.
4. Изучение хронической токсичности противотуберкулёзного нанокомпозита для лечения туберкулёза с лекарственной устойчивостью на основе наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг и др. //XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2009. – С. 288 – 289.
5. Проблема химиорезистентности МБТ и возможности её решения при комбинированном применении противотуберкулёзных препаратов и наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, О.Ю.Соснина и др.// XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2009. – С. 287 – 288.
6. Подавление роста лекарственно-устойчивых штаммов МБТ противотуберкулёзным композитом на основе изониазида и наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, О.Ю.Соснина,

Г.Н.Крейцберг //XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2009. – С. 286 – 287.

7. Сравнительная оценка подавления роста лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулёза различными химиопрепаратами в сочетании с наночастицами серебра in vitro/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг, И.В.Голиков // XIX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: Сборник трудов конгресса. – М., 2009. – С. 285 – 286.
8. Захаров А.В.Оценка бактериостатических и бактерицидных параметров противотуберкулёзных композитов на основе наночастиц серебра/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, Г.Н.Крейцберг//XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» по болезням органов дыхания: сбор. матер. конгресса. Тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 618.
9. Захаров А.В.Токсические и фармакокинетические характеристики противотуберкулёзного нанокомпозита на основе наночастиц серебра/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, Г.Н.Крейцберг //XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» по болезням органов дыхания: сбор. матер. конгресса. Тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 619.
10. Кибрик Б.С. Эффективность нанокомпозитов в лечении лекарственно-устойчивого экспериментального туберкулёза/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг //XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» по болезням органов дыхания: сбор. матер. конгресса. Тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 634.
11. Кибрик Б.С. Нанотехнологии в химиотерапии резистентного туберкулёза/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг //XVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» по болезням органов дыхания: сбор. матер. конгресса. Тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 634.
12. Изучение бактериостатической активности противотуберкулёзного нанокомпозита для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, О.Ю.Соснина, Г.Н.Крейцберг//XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С. 183 – 184.
13. Подавляющая активность противотуберкулёзных препаратов резервного ряда в сочетании с наночастицами серебра в отношении резистентных штаммов МБТ in vitro/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, О.Ю.Соснина, Г.Н.Крейцберг//XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С.184.
14. Тестирование концентраций наночастиц серебра, подавляющих рост резистентных штаммов МБТ in vitro в монорежиме и в комбинации с химиопрепаратами/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, О.Ю.Соснина, Г.Н.Крейцберг //XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С.185.

15. Подавление роста резистентных штаммов МБТ противотуберкулёзными препаратами первого ряда в сочетании с наночастицами серебра in vitro/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, О.Ю.Соснина, Г.Н.Крейцберг // XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С. 185 – 186.
16. Кибрик Б.С. Эффективность нанокомпозита в лечении экспериментального туберкулёза по критерию выживаемости/ Б.С.Кибрик, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг//XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С.371 - 372.
17. Влияние наночастиц серебра на концентрацию изониазида в лёгочной ткани крыс/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, А.А.Раков, Г.Н.Крейцберг//XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С. 372 – 373.
18. Эффективность лечения экспериментального резистентного туберкулёза нанокомпозитом по критерию высеваемости / А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, О.Ю.Соснина, Г.Н.Крейцберг//XX Национальный Конгресс по болезням органов дыхания: сбор. науч. трудов. – М., 2010. – С. 373 – 374.
19. Захаров А.В.Новый противотуберкулёзный препарат на основе наночастиц серебра/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, Г.Н.Крейцберг//Всеросс. науч.- практ. конф. с междунар. участием «Совершенствование мед. помощи больным туберкулёзом»: матер. конф. – С-Петербург, 2010. – с. 205 – 206.
20. Инновационные подходы к использованию нанотехнологий в производстве противотуберкулёзных препаратов/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров и др.// В кн. Инновации. Бизнес. Образование. – 2010: Сб. матер. Международного форума – Ярославль, 2-3 ноября 2010. – с. 204 – 206.
21. НАНОКОМПОЗИТ «ISONIAZIDI+Ag» в лечении туберкулёза in vitro, in vivo (Экспериментальное исследование). Монография. // Кибрик Б.С., Захаров А.В., Крейцберг Г.Н. – Ярославль: Изд-во «ЯрМедиаГруп», 2010. – 190 с.
22. Захаров А.В., Кибрик Б.С., Павлов А.В. Эффективность лечения экспериментального туберкулёза с использованием наночастиц серебра/А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, А.В.Павлов //Туберкулёз и болезни лёгких. – 2011. - №4. – с.151-152.
23. Кибрик Б.С. Инновационные подходы к лечению резистентного туберкулёза с использованием нанотехнологий/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров//Инновационные технологии в организации фтизиатрической и пульмонологической помощи населению: матер. науч.-прак. конф. – С-Петербург, 11-12 мая 2011г. – с. 137-138.
24. Экспериментальное обоснование преодоления резистентности возбудителя туберкулёза нанокомпозитом изониазида и наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров, Г.Н.Крейцберг//Экспер. и клинич. Фармакология. - 2011. – том.74, №4. – с. 24-26.

25. Влияние наночастиц серебра на фармакокинетику изониазида в эксперименте/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров, А.А.Раков// XXI Национальный конгресса по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М.,2011. – 287 – 288.
26. Кибрик Б.С. Эффективность наночастиц серебра в лечении экспериментального резистентного туберкулёза по критериям морфобиометрии/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров// XXI Национальный конгресса по болезням органов дыхания: сбор. трудов конгресса. – М., 2011. – 289 – 290.
27. Новые подходы к лечению больных туберкулёзом с лекарственной устойчивостью возбудителя с использованием наночастиц серебра/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров, О.Ю.Соснина//Туберкулёз и болезни лёгких, 2011. - №11. – с.37-41.
28. Токсикологическая оценка нанокомпозита для лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза/ Б.С.Кибрик, А.В.Павлов, А.В.Захаров и др. //Токсикологический вестник. - 2012. - №3. – с.28-33.
29. Пути повышения эффективности химиотерапии туберкулёза лёгких в условиях роста устойчивости возбудителя/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик, А.В.Павлов и др. //Междисциплинарные аспекты дифференциальной диагностики и лечения больных туберкулезом: матер. научно-практической конференции, Москва, 18-20 апреля 2012 г. – с. 26-27.
30. Захаров А.В. Повышение эффективности химиотерапии туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя в эксперименте с помощью наносеребра/ А.В.Захаров, Б.С.Кибрик// Туберкулёз и болезни лёгких. - 2015. – том 93. - №7. – с.47.
31. Патент 2403050 Российская Федерация (RU), МПК: A61K A61P B82B. КОМБИНИРОВАННЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ДЕЙСТВИЯ/ Кибрик Б.С., Лобановский В.М., Захаров А.В., Соснина О.Ю., Крейцберг Г.Н., Голиков И.В., Завойстый И.В., Уставщиков О.Б., Грачёва И.Е., Крейцберг О.Г. - заявка:2008142461/15, заявл. 28.10.2008, опубликовано: 10.11.2010.
32. Захаров А.В. Наночастицы серебра в решении проблемы лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза/ А.В.Захаров, А.Л.Хохлов, А.Э.Эргешов//Архивъ внутр. медиц. - 2017; 7(3): с. 188-199. DOI: 10.20514/2226-6704-2017-7-3-188-199
33. Захаров А.В. Особенности клинического течения туберкулёза лёгких при устойчивости возбудителя к изониазиду и экспериментальное обоснование преодоления резистентности наночастицами серебра/ А.В.Захаров, А.Э.Эргешов, А.Л.Хохлов //Туберкулёз и сочетанные инфекции: вызовы и перспективы: матер. Всеросс. научно-практич. конф. с междунар. участием - ООО «НЬЮ ТЕРРА», 2017. – с. 18-19.

34. Эффективность сочетания изониазида и наночастиц серебра в лечении экспериментального туберкулёза/ А.В.Захаров, А.Э.Эргешов, А.Л.Хохлов, Б.С.Кибрик// Туберкулёз и болезни лёгких. - 2017. – том 95. - № 6. – с.51-58.
35. Эффективность применения наночастиц серебра в лечении экспериментального туберкулёза по бактериологическим критериям/ А.В.Захаров, А.Э.Эргешов, А.Л.Хохлов и др. // Туберкулёз и социально значимые заболевания. - 2017. - № 3. – с. 4-11.
36. Захаров А.В. Особенности течения и эффективность лечения туберкулёза лёгких у пациентов пожилого и старческого возраста при устойчивости возбудителя к изониазиду/ А.В.Захаров, А.Л.Хохлов, А.Э.Эргешов //Клиническая геронтология. - 2017. – Том: 23. - № 7-8. – с. 17-21.
37. Захаров А.В.Эффективность применения наночастиц серебра на модели клинических изолятов возбудителя туберкулёза с различной лекарственной устойчивостью/ А.В.Захаров, А.Л.Хохлов//Вестник ЦНИИТ. - 2018. - № 1. – с.65-75.
38. Захаров А.В. Экспериментальное обоснование применения наночастиц серебра для повышения эффективности лечения лекарственно-устойчивого туберкулёза/ А.В.Захаров, А.Л.Хохлов, А.Э.Эргешов //Экспер. и клинич. Фармакология. - 2018. – том.81, приложение. – с. 90.
39. Клинические особенности туберкулёза лёгких при устойчивости возбудителя к изониазиду в сравнении с МЛУ-ТБ/ А.В.Захаров, А.Э.Эргешов, А.Л.Хохлов и др. // Туберкулёз и социально значимые заболевания, 2018. - №3. – с. 61-62.
40. Подавляющее действие наночастиц серебра in vitro на лекарственно-устойчивые штаммы МБТ/ А.В.Захаров, А.Э.Эргешов, А.Л.Хохлов и др. // Туберкулёз и социально значимые заболевания, 2018. - №3. – с. 62-63.
41. Захаров А. Инновационные подходы в лечении лекарственно-устойчивого туберкулёза с использованием наночастиц серебра /А.В.Захаров, А.Л.Хохлов, А.Э.Эргешов //Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении: сбор. тезисов Медицинского профессорского форума 5-6 декабря 2018 года, Ярославль - ООО «Национальная полиграфическая группа». - 2018. – с. 21-23.
42. Захаров А.В. Исследование активности наночастиц серебра in vitro и in vivo в отношении лекарственно-устойчивых штаммов Mycobacterium tuberculosis/ А.В.Захаров, А.Л.Хохлов//Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2018. – выпуск 3 (67). – с. 43-46.
43. Захаров А.В. Результаты экспериментальных исследований применения наночастиц серебра при туберкулёзе с лекарственной устойчивостью возбудителя / А.В.Захаров, А.Л.Хохлов //Мед. вестник Север. Кавказа. - 2019. - №1. – с. 195-199.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Cs	– циклосерин
E	– этамбутол
H (INH)	– изониазид
Km	– канамицин
Am	– амикацин
Lfx	– левофлоксацин
Mfx	– моксифлоксацин
PAS	– парааминосалициловая кислота
Pto	– протионамид
Eto	– этионамид
R (RIF)	– рифампицин
Cm	– капреомицин
Rb	– рифабутин
S	– стрептомицин
Z	– пиразинамид
FIC	– фракционная ингибирующая концентрация
ΣFIC	– фракционный ингибирующий индекс
АСМ	– атомно-силовой микроскоп (-ия)
ВОЗ (WHO)	– Всемирная Организация Здравоохранения
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
КМО	– коэффициент массы органа
КОЕ	– колониеобразующие единицы
КУМ	– кислотоустойчивые микобактерии
МБТ	– микобактерии туберкулёзного комплекса
МБК	– минимальная бактерицидная концентрация
ЛУ	– лекарственная устойчивость
ЛЧ	– лекарственная чувствительность
МА	– митотическая активность
МИ	– митотический индекс
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
МЛУ-МБТ	–МБТ с множественной лекарственной устойчивостью
МЛУ ТБ	– туберкулёз, вызванный возбудителем с МЛУ
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МЭ	– мутагенный эффект
ШЛУ	– широкая лекарственная устойчивость
НЧ	– наночастицы
НЧС (AgNp)	– наночастицы серебра
НК	– нанокомпозит
Нм	– нанометр (м-^{9})

Заказ № Объем п.л. Тираж 100 экз.

Выходные данные типографии