

Д.С. Суханов¹, Т.И. Виноградова², С.Н. Демидик³,
Н.В. Заболотных², С.Н. Васильева², А.Л. Коваленко⁴, М.Л. Витовская²

Иммунотропная и антигипоксанта́ная терапия экспериментального лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза

¹ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Министерства Здравоохранения РФ, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4

³ Учреждение образования Гродненский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 230009, Республика Беларусь, г.Гродно, ул. Горького, 80

⁴ ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», 191119, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 112

Представлены результаты доклинического изучения циклоферона, ремаксола и рунихола на модели экспериментального генерализованного туберкулеза, вызванного МБТ с различным спектром лекарственной чувствительности. Установлено существенное повышение лечебного эффекта химиотерапии с помощью циклоферона и ремаксола. Это проявилось усилением клиренса легких от МБТ, снижении распространенности специфического воспаления в легких по индексу поражения легких, стимуляции поглотительной и переваривающей способности перитонеальных макрофагов, ингибированной в ходе развития экспериментальной туберкулезной инфекции. Рунихол не оказывал влияния на эффективность химиотерапии при отсутствии стимулирующего влияния на фагоцитарную функцию пМф.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулез, циклоферон, ремаксол, рунихол

D.S. Sukhanov, T.I. Vinogradova, S.N. Demidik,
N.V. Zabolotnyh, S.N. Vasilieva, A.L. Kovalenko, M.L. Vitovskaya

Immunotropic and antihypoxant therapy of experimental drug-sensitive and drug-resistant tuberculosis

¹ Mechnikov North-Western State Medical University, 41, Kirochnaya str., Saint-Petersburg, 191015, Russia

² Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology, 2-4, Ligovskiy distr., Saint-Petersburg, 191036, Russia

³ Grodno State Medical University, 80, Gorkogo str., Grodno, 230009, Belarus

⁴ «POLYSAN» Ltd, 112, Ligovskiy distr., Saint-Petersburg, 191119, Russia

The results of pre-clinical research of cycloferon, remaxol and runihol on the model of experimental generalized tuberculosis, caused by the MBT with a different spectrum of drug sensitivity are presented. A considerable increase of the curative effect of the therapy with the used of cycloferon and remaxol. There was manifested the strengthening of lung clearance from the office, reducing the prevalence of specific inflammation in the lungs of the index of lung damage, stimulation of sorption and destructive ability of peritoneal macrophages, inhibited in the course of development of experimental tuberculosis infection. Runihol has no impact on the effectiveness of chemotherapy in the absence of a stimulating influence on the phagocytic function of the peritoneal macrophages.

Key words: experimental tuberculosis, cycloferon, remaxol, runihol

Недостаточная эффективность лечения туберкулеза в современных условиях, особенно при наличии лекарственной устойчивости возбудителя, вызывает необходимость поиска новых методов и средств терапии. Наряду с внедрением новых этиотропных

средств воздействия, большое значение имеет использование фармакологических препаратов патогенетической направленности [3]. Комбинированная химиотерапия, вызывая нарушения в клеточном метаболизме, отрицательно влияет на функциональную активность иммунокомпетентных клеток и делает обоснованным применение лекарственных препаратов, усиливающих фагоцитарные реакции, что способствует элиминации возбудителя туберкулеза [1, 5, 8].

Для корреспонденции: Суханов Дмитрий Сергеевич, канд. мед. наук, доц. каф. фтизиопульмонологии и торакальной хирургии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава РФ. E-mail: dmitriysukhanov@mail.ru

Перспективными патогенетическими препаратами в лечении туберкулеза являются индукторы интерферона (циклоферон) и препараты на основе янтарной кислоты (ремаксол, рунихол), эффективность которых показана в ряде доклинических и клинических исследованиях [6, 7]. Вместе с тем, данные о влиянии вышеперечисленных препаратов на течение туберкулезного процесса в эксперименте в настоящее время отсутствуют.

Цель исследования — доклиническое изучение действия циклоферона, ремаксоло и рунихола на модели экспериментального генерализованного туберкулеза.

Методика

Эксперименты проводились на 218 белых нелинейных мышах-самцах, распределенных на группы с помощью метода рандомизации. Поставлено 2 серии опытов на моделях экспериментального генерализованного лекарственно чувствительного (ЛЧТ) и лекарственно устойчивого туберкулеза (ЛУТ).

1-я серия — экспериментальный туберкулез, вызванный лекарственно чувствительным штаммом *M. tuberculosis Erdman*. Для моделирования туберкулеза использовали лабораторный тест-штамм *M. tuberculosis Erdman* (входящий в *Mycobacterium tuberculosis complex*), чувствительный к противотуберкулезным препаратам, из коллекции ФГУ «НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича». Заражающая доза — 10^6 КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий туберкулеза (МБТ) вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Группы животных:

1. Интактные мыши (*незараженные, нелеченные*) — 15 шт.;

2. Зараженные мыши без лечения (*контроль заражения*) — 20 шт.;

3. Зараженные мыши, получавшие полихимиотерапию (ПХТ): изониазид (10 мг/кг, подкожно) + рифампицин (10 мг/кг, внутривенно) + пиперазидин (20 мг/кг, внутривенно) — *контроль полихимиотерапии* — 18 шт.;

4. Зараженные мыши, получавшие циклоферон (3,6 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + ПХТ — 18 шт.;

5. Зараженные мыши, получавшие ремаксол (25 мг/кг, внутривенно, 14 введений, 5 инъекций в неделю) + ПХТ — 18 шт.;

6. Зараженные мыши, получавшие рунихол (396 мг/кг, внутривенно) + ПХТ — 18 шт.

2-я серия — экспериментальный туберкулез, вызванный лекарственно устойчивым клиническим штаммом №9660 ФГБУ СПбНИИФ Минздрава РФ. Для моделирования туберкулеза использовали

клинический изолят МБТ №9660 СПбНИИФ, устойчивый к изониазиду (1 мг/мл), рифампицину (40 мг/мл), стрептомицину (10, 50 мг/мл), этионамиду (2 мг/мл), канамицину (30 мг/мл) выделенный от больного впервые выявленным туберкулезом легких. Заражающая доза — 10^6 КОЕ/мышь в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий туберкулеза (МБТ) вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Группы животных:

1. Интактные мыши (*незараженные, нелеченные*) — 15 шт.;

2. Зараженные мыши без лечения (*контроль заражения*) — 20 шт.;

3. Зараженные мыши, получавшие полихимиотерапию (ПХТ): протионамид (12,5 мг/кг, внутривенно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + левофлоксацин (20 мг/кг, внутривенно) + ПАСК (140 мг/кг, внутривенно) + циклосерин (8 мг/кг, внутривенно) — *контроль полихимиотерапии* — 19 шт.;

4. Зараженные мыши, получавшие циклоферон (3,6 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + ПХТ — 19 шт.;

5. Зараженные мыши, получавшие ремаксол (25 мг/кг, внутривенно, 14 введений, 5 инъекций в неделю) + ПХТ — 19 шт.;

6. Зараженные мыши, получавшие рунихол (396 мг/кг, внутривенно) + ПХТ — 19 шт.

В обеих сериях опытов с 7-х сут. после заражения с периодичностью в 2—3 сут. проводилось вскрытие мышей (n=2) с целью визуализации в легких очагов специфического воспаления. Через 17 сут. после инокуляции инфекта в легких зараженных животных были обнаружены очаги специфического воспаления, с этого дня в опытных группах начато лечение. Курс лечения во всех исследуемых группах составил 6 нед.

В течение исследования регистрировали:

а) индекс поражения легких (устанавливали по совокупности экссудативных и продуктивных изменений) в условных единицах — баллах [1];

б) биометрические показатели (коэффициенты массы (КМ) легких и селезенки);

в) бактериологические показатели (количество колониеобразующих единиц — КОЕ);

г) фагоцитоз перитонеальных макрофагов (пМф): фагоцитарная активность Мф (ФА), фагоцитарное число (ФЧ), показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ), индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ).

Индекс эффективности лечения ИЭ (%) рассчитывали как долевую разницу показателей тяжести течения туберкулезной инфекции в контрольных группах и в группах животных, получавших исследуемые препараты.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью метода ANOVA для множественного сравнения выборочных средних с последующим использованием защищенного t-критерия. При анализе показателей фагоцитоза с учетом распределения данных, отличного от нормального, применялся непараметрический тест Краскела—Уоллиса с последующим попарным сравнением с помощью теста Данна [2]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Эффективность изучаемых препаратов при ЛЧ туберкулезе

Инокуляция животным лекарственно чувствительного штамма *M. tuberculosis Erdman* вызывала клиническую картину генерализованного туберкулеза с преимущественным поражением легких, что нашло отражение в высоких значениях индекса поражения легких — $3,1 \pm 0,05$ усл. ед., а также среднего суммарного показателя пораженности — 44,99 усл. ед.

В группе контроля химиотерапии на этом сроке отмечено снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы легких в 3,1 раза, индекса поражения легких в 1,5 раза (с $3,1 \pm 0,05$ усл. ед. до $2,05 \pm 0,06$ усл. ед.). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса легких от МБТ в 6,7 раза ($171,4 \pm 22,69$ КОЕ $\times 10^3$ против $25,4 \pm 1,72$ КОЕ $\times 10^3$, $p < 0,001$). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы легких — на 67,95%, по индексу поражения легких — на 33,87%, по коэффициенту массы селезенки — на 56,06%, по высеваемости МБТ из легких — на 85,18%. При этом средний суммарный ИЭ химиотерапии составил +60,77%.

В условиях дополнительного применения циклоферона наблюдалось повышение эффективности химиотерапии на 27,9%, что способствовало достоверному снижению индекса поражения легких в 1,2 раза ($2,05 \pm 0,06$ усл. ед. против $1,65 \pm 0,02$ усл. ед., $p < 0,001$) и числа КОЕ МБТ из легких в 4,9 раза ($5,2 \pm 1,76$ усл. ед. против $25,4 \pm 1,72$ усл. ед., $p < 0,001$).

Использование ремаксола на фоне противотуберкулезной терапии также снижало показатели тяжести течения инфекции: индекс поражения легких в 1,2 раза (с $2,05 \pm 0,06$ усл. ед. до $1,75 \pm 0,03$ усл. ед., $p < 0,001$). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса легких от МБТ в 3,8 раза, ($25,4 \pm 1,72$ КОЕ $\times 10^3$ против $6,7 \pm 2,5$ КОЕ $\times 10^3$, $p < 0,001$). Отмечен прирост индексов эффективности по трем из четырех исследуемых показателей: по коэффициенту массы легких — на 9,02%, по индексу

поражения легких — на 14,63%, по высеваемости МБТ из легких — на 73,62%. При этом прирост эффективности лечения в среднем за счет ремаксола составил 20,44% по сравнению с группой контроля химиотерапии.

В условиях применения рунихола в комбинации с ПТП большинство показателей не отличались от таковых в группе контроля химиотерапии. Отмечен незначительный прирост интегрального показателя эффективности терапии — бактериовыделения МБТ из легких, который составил +12,99% при +79,53% и +73,62% у животных, леченных соответственно циклофероном и ремаксолом. Средний совокупный прирост эффективности лечения за счет применения рунихола составил 6,78%.

Анализ эффективности фагоцитоза пМф показал, что у зараженных *M. tuberculosis Erdman* нелеченных мышей на фоне обширного туберкулезного поражения легочной ткани развивается достоверное угнетение как поглотительной, так и переваривающей способности Мф по всем тестируемым показателям при сравнении с интактной группой. Фагоцитарная активность снижалась в среднем до 39,2% против 55,0% у интактных мышей ($p < 0,05$), фагоцитарное число — до 3,98 дрожжевых клеток против 5,4 дрожжевых клеток ($p < 0,01$), показатель завершенности фагоцитоза — до 36,8 дрожжевых клеток против 178 ($p < 0,01$), индекс завершенности фагоцитоза — до 1,39 усл. ед. против 3,05 усл. ед. ($p < 0,01$).

Активность фагоцитоза у мышей, получавших шестинедельный курс комбинации ПХТ по 2 из 4 из четырех исследованных показателей (фагоцитарное число и индекс завершенности фагоцитоза) была значимо ниже, чем у животных группы контроля заражения. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований и демонстрируют ингибцию поглотительной и переваривающей функции макрофагов под влиянием длительной (более месяца) терапии противотуберкулезными препаратами [4].

Включение циклоферона в терапию лекарственно чувствительного туберкулеза у мышей приводило к существенной стимуляции активности ингибированных туберкулезной инфекцией и длительной специфической терапией пМф по всем изученным показателям ($p < 0,05—0,01$ по сравнению с показателями группы контроля химиотерапии) — фагоцитарная активность достигла 91,3%, а фагоцитарное число — 80,2% от уровня здоровых нелеченных животных. Переваривающая способность пМф была стимулирована несколько слабее (показатель завершенности фагоцитоза — до 57,3%, индекс завершенности фагоцитоза — до 59,0% от уровня интактной группы), но ее параметры также оказались статистически значимо выше, чем у мышей, леченных только ПТП.

Ремаксол оказывал существенное положительное влияние как на поглотительную, так и на переваривающую способность пМф, значимо повышая все показатели по сравнению с параметрами группы контроля химиотерапии ($p < 0,05—0,01$). Подобно циклоферону ремаксол, более активно стимулировал поглотительную способность пМф, повысив фагоцитарную активность до 89,1%, а фагоцитарное число — до 87,0% от уровня здоровых нелеченных мышей. Переваривающая способность макрофагов подвергалась меньшей стимуляции (показатель завершенности фагоцитоза — до 52,8%, индекс завершенности фагоцитоза — до 54,1% от уровня интактной группы), но также существенно превышала аналогичные показатели как контроля заражения, так и контроля химиотерапии.

Назначение рунихола практически не повлияло на фагоцитарную функцию пМф: параметры как поглотительной, так и переваривающей способности макрофагов находились на уровне мышей группы контроля химиотерапии.

Эффективность изучаемых препаратов при ЛУ туберкулезе

При инокуляция животным клинического изолята ЛУ МБТ развивалась клиническая картина генерализованного туберкулеза с преимущественным поражением легких с наличием экссудативных изменений и продуктивных очагов спедифического воспаления, в посевах гомогенатов легких отмечен сплошной рост МБТ.

Под влиянием проведенной химиотерапии отмечено достоверное снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы легких в 1,7 раза ($p < 0,05$) и индекса их поражения в 1,2 раза ($p < 0,001$), а также коэффициента массы селезенки в 1,4 раза ($p < 0,01$). Зарегистрировано также и достоверное увеличение в 2,8 раза клиренса легких от МБТ ($p < 0,02$). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы легких — на 40,9%, по индексу поражения легких — на 13,0%, по коэффициенту массы селезенки — на 29,9%, по высеваемости МБТ из легких — на 64,8%. При этом средний суммарный индекс эффективности лечения составил +36,9%.

Включение циклоферона в комплексную химиотерапию существенно повышало ее эффективность, о чем свидетельствовали достоверное снижение индексов поражения легких в 1,2 раза ($2,36 \pm 0,07$ усл. ед. против $2,75 \pm 0,07$ усл. ед. у мышей контроля химиотерапии, $p < 0,001$, прирост индекса эффективности — на 14,18%) и высеваемости МБТ из легких в 2,4 раза ($19,4 \text{ КОЕ} \times 10^4$ против $45,9 \pm 2,5 \text{ КОЕ} \times 10^4$,

$p < 0,001$, прирост индекса эффективности на 57,73%). Вычисление среднего индекса эффективности лечения показало его повышение по сравнению с группой контроля химиотерапии на 22,71% за счет трех из четырех тестируемых показателей: коэффициента массы легких — на 25,71%, индекса их поражения — на 14,18%, а также числа КОЕ — на 57,73%.

При назначении ремаксола также отмечен более отчетливый лечебный эффект. Так, на момент завершения курса лечения под влиянием ремаксола произошло достоверное снижение индекса поражения легких в 1,14 раза ($2,42 \pm 0,06$ усл. ед. против $2,75 \pm 0,07$ усл. ед. в контроле химиотерапии, $p < 0,001$) и уменьшение высеваемости МБТ в 1,98 раза ($23,2 \pm 1,3 \text{ КОЕ} \times 10^4$ против $45,9 \pm 2,5 \text{ КОЕ} \times 10^4$, $p < 0,001$). По этому показателю зарегистрирован наиболее высокий прирост эффективности терапии — на 49,46%. Средний прирост эффективности за счет применения ремаксола на фоне ПТП составил +23,74%.

В условиях применения рунихола в комплексе с ПТП наблюдался незначительный прирост эффективности лечения — всего на 6,39%, в основном по коэффициенту массы легких и по высеваемости МБТ.

Функциональное состояние пМф при распространенном лекарственно устойчивом туберкулезе на 59-е сут. после заражения имело практически ту же степень ингибиции, что и при лекарственно чувствительном процессе. У зараженных нелеченных мышей все показатели фагоцитоза были достоверно ($p < 0,01$) ниже, чем в интактной группе и составляли 12,7—73,0% от соответствующих значений у здоровых мышей.

Этиотропная терапия (PtATPASCs) в данном опыте слабо отражалась на состоянии поглотительной и переваривающей функции макрофагов. Отмечено значимое снижение при ее использовании одного из показателей поглотительной способности пМф — фагоцитарной активности (35,0% при 44,8% в контроле заражения, $p < 0,05$).

Включение циклоферона в базовую химиотерапию приводило к значительной стимуляции как поглотительной, так и переваривающей способности пМф по достоверному повышению трёх из четырёх исследованных параметров фагоцитоза. Так, фагоцитарная активность увеличивалась в 1,4 раза (48,0% против 35,0% в группе контроля химиотерапии, $p < 0,05$), ПЗФ — в 2,27 раза — (78,2 дрожжевых клеток против 34,4 дрожжевых клеток, $p < 0,05$), ИЗФ — в 1,76 раза — ($2,12$ усл. ед. против $1,2$ усл. ед., $p < 0,01$).

Под действием ремаксола, как и циклоферона, фагоцитарная функция пМф у мышей практически по всем параметрам оказалась достоверно повышенной по отношению к группе контроля химиотерапии. Фагоцитарная активность при использовании ремаксола возрастала на 45,7% по сравнению с группой контроля лечения ($p < 0,01$), показатель завершенности фагоцитоза — на 183,4% ($p < 0,01$), а индекс завершенности фагоцитоза — на 69,2% ($p < 0,01$).

Применение рунихола не оказывало стимулирующего эффекта на показатели фагоцитоза пМф, все исследованные параметры фагоцитарной функции макрофагов достоверно не отличались от таковых у мышей группы контроля химиотерапии и были значительно снижены по сравнению с показателями животных интактной группы.

Заключение

Таким образом, анализ полученных результатов убедительно продемонстрировал отчетливое и значимое повышение эффективности химиотерапии лекарственно чувствительного и лекарственно устойчивого туберкулеза у мышей в условиях применения циклоферона и ремаксола в комплексе с основными и резервными ПТП. Применение рунихола на обеих моделях не оказывало влияния на эффективность химиотерапии.

Полученные данные по изучению влияния исследованных препаратов на фагоцитарную функцию пМф свидетельствуют о том, что циклоферон и ремаксол при их использовании в составе комплексной химиотерапии лекарственно чувствительного и лекарственно устойчивого туберкулеза у мышей оказывало стимулирующее воздействие на поглотительную и переваривающую способность пМф, резко угнетенную как самой туберкулезной инфекцией, так и длительной массивной химиотерапией. В условиях же приме-

нения рунихола параметры фагоцитоза пМф не изменялись по отношению к таковым в группе мышей, получавших только резервные ПТП.

Список литературы

1. *Александрова А.Е., Ариэль Б.М.* Оценка тяжести туберкулезного процесса в легких мышей // Пробл. туб. — 1993. — №3. — С. 52-53.
2. *Банержи А.* Медицинская статистика понятным языком. — М.: Практическая медицина, 2007. — 287 с.
3. *Васильева И.А., Самойлова А.Г., Багдасарян* и др. Зависимость результатов лечения больных туберкулезом легких от спектра лекарственной устойчивости возбудителя // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — №10. — С. 28-32.
4. *Витовская М.Л.* Оценка эффективности сухого экстракта из слоевищ цетрарии исландской (ислацета) в терапии генерализованного туберкулеза (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — СПб., 2005. — 23 с.
5. *Лядова И.В., Гергерт В.Я.* Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования // Проблемы туберкулеза. — 2009. — №11. — С. 9-18.
6. *Романцов М.Г., Мельникова И.Ю.* Возможности использования циклоферона при вирусных и бактериальных инфекциях у детей. Интерферон 2011. Сборник научных статей (к 80-летию академика РАМН Ф.И. Ершова). — М., 2012. — С. 232-252.
7. *Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В.* и др. Сравнительное изучение гепатопротективного действия ремаксола, реамберина и адеметионина при повреждении печени противотуберкулезными препаратами // Антибиотики и химиотерапия. — 2011. — Т. 56, №1. — С. 13-18.
8. *Easton D.M., Nijnik A., Hancock R.E.W.* Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives // Trends in Biotechnology. — 2009. — Vol. 27, №10. — P. 582-590.

Поступила 03.12.12

Сведения об авторах:

Виноградова Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

Демидик Светлана Николаевна, ассистент каф. фтизиопульмонологии и профпатологи УО ГрГМУ Минздрава РФ

Заболотных Наталья Вячеславовна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

Васильева Светлана Николаевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ

Коваленко Алексей Леонидович, д-р биол. наук, дир. по науке ООО «НТФФ «ПОЛИСАН»

Витовская Мария Львовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава РФ