

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИКЛОФЕРОНА ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Д. С. Суханов, Т. И. Виноградова, С. Н. Демидик, А. В. Елькин,
Н. В. Заболотных, С. Н. Васильева, М. Л. Витовская, М. Г. Романцов¹

Представлены результаты экспериментального изучения эффективности циклоферона в составе комплексной химиотерапии генерализованного лекарственно устойчивого туберкулеза. Установлен существенный лечебный эффект циклоферона (3,6 мг/кг), проявляющийся в повышении клиренса легких от микобактерий туберкулеза, снижении распространенности специфического воспаления в легких и исчезновении альтеративного компонента туберкулезного процесса. Параллельно отмечена активация признаков напряженности местного иммунитета легочной ткани: по изменению клеточного состава гранулем и по более частому обнаружению крупных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Назначение циклоферона значимо повысило поглотительную и переваривающую активность фагоцитоза перитонеальных макрофагов, ингибированного в ходе развития экспериментальной туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: экспериментальный туберкулез; лекарственная устойчивость; химиотерапия; циклоферон

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в Российской Федерации, как и во всем мире, уделяют внимание изучению распространения туберкулеза, вызванного штаммами микобактерий туберкулеза (МБТ) с лекарственной устойчивостью (ЛУ) возбудителя [6]. Терапия пациентов с ЛУ МБТ требует значительно более дорогостоящего лечения с применением противотуберкулезных препаратов резервного ряда. Вместе с тем ее эффективность остается низкой – 66,3 – 66,7 % у пациентов с множественной ЛУ, а в случае наличия широкой лекарственной устойчивости — 48,3 % [2].

Перспективными иммуностропными препаратами, применяющимися в комплексной терапии туберкулеза, являются индукторы интерферонов, представляющие семейство высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений. Индукторы интерферонов стимулируют пролиферацию, дифференцировку клеток костного мозга, используя механизмы естественного (врожденного) и адаптивного (приобретенного) иммунитета. Во фтизиатрической практике применяют амиксин и циклоферон [5].

Вместе с тем экспериментальное обоснование эффективности индукторов интерферона, в частности, циклоферона при туберкулезе отсутствует.

Цель исследования — изучение эффектов включения в комплексную терапию экспериментального лекарственно устойчивого туберкулеза иммуномодулятора циклоферона.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 79 белых нелинейных мышах-самцах.

Для моделирования туберкулеза использовали клинический изолят МБТ № 5419 СПбНИИФ, устойчивый к изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этионамиду (30 мкг/мл), выделенный от больного впервые выявленным туберкулезом легких. Микобактериальную суспензию для заражения мышей готовили *ex tempore* из трехнедельных штаммов МБТ второй генерации, культивируемых на среде Левенштейна-Йенсена. Заражающая доза — $1 \cdot 10^7$ колониеобразующих единиц (КОЕ) в 0,2 мл физиологического раствора. Суспензию микобактерий туберкулеза вводили мышам в латеральную хвостовую вену (0,2 мл).

Мониторинг развития туберкулезного процесса осуществляли, начиная с 8-го дня после заражения, путем визуального осмотра легких при вскрытии 2 – 3 мышей. На 17-й день после инфицирования, когда в легких отчетливо визуализировались множественные

¹ Кафедра фтизиатрии и торакальной хирургии (зав. — проф. А. В. Елькин) ГБОУ ВПО Северо-Западный медицинский университет им. И. И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41. Лаборатория экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий (руководитель — проф. Т. И. Виноградова) ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт физиопульмонологии.

субмилиарные ($d < 1$ мм) и единичные милиарные ($d > 1$ мм) очаги специфического воспаления, все мыши ($n = 79$) были распределены на следующие группы.

1 — интактные мыши (незараженные, нелеченные) — 15 животных;

2 — зараженные мыши без лечения (контроль заражения) — 16;

3 — зараженные мыши, получавшие полихимиотерапию: изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + этамбутол (50 мг/кг, в желудок) + левофлоксацин (20 мг/кг, в желудок) — контроль полихимиотерапии — 16;

4 — зараженные мыши, получавшие циклоферон (3,6 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + этамбутол (50 мг/кг, в желудок) + левофлоксацин (20 мг/кг, в желудок) — 16;

5 — зараженные мыши, получавшие циклоферон (7,2 мг/кг, внутривенно, 3 раза в неделю) + изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + этамбутол (50 мг/кг, в желудок) + левофлоксацин (20 мг/кг, в желудок) — 16 животных.

Введение лекарственных препаратов во всех подопытных группах начинали на фоне распространенного специфического поражения легких при регистрации в легких множественных субмилиарных (< 1 мм) либо единичных милиарных очагов — с 17-го дня после заражения, курс лечения — 8 недель. Базовая химиотерапия составлена из четырех противотуберкулезных препаратов в высших терапевтических дозах — изониазид, амикацин, этамбутол и левофлоксацин — с учетом спектра лекарственной чувствительности штамма МБТ, а также с учетом стандартов, представленных в приложении № 6 к приказу Минздрава России № 109 от 21.03.2003 “Инструкция по химиотерапии больных туберкулезом”. Этот режим химиотерапии отработан в наших предшествующих экспериментах и показал оптимальные результаты лечения экспериментального генерализованного туберкулеза, вызванного клиническим изолятом МБТ № 5419 СПбНИИФ [3].

Оценке подлежали следующие показатели: летальность, индекс поражения легких — совокупность эксудативных и продуктивных изменений в условных единицах - баллах [1], коэффициент массы (КМ) легких и селезенки. Массивность роста МБТ выражали в числе КОЕ на массу легких при посеве гомогената легких на среду Левенштейна-Йенсена. При гистологическом изучении легких орган фиксировали в 10 % формалине, заливали в целлоидин-парафин-масло, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Фагоцитоз перитонеальных макрофагов (пМф) исследовали в однослойной культуре ($1 \cdot 10^6$ клеток) на пластиковых одноразовых чашках Петри в отношении клеточной взвеси дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* ($1 \cdot 10^7$ клеток), опсонизированных сывороткой мышей. Вы-

числяли: фагоцитарную активность Мф (ФА) — процент Мф, вовлеченных в фагоцитоз; фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество дрожжей, поглощенных одной фагоцитирующей клеткой; показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) — количество дрожжей, переваренных макрофагами за 1,5 ч культивирования; индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) — отношение фагоцитарного числа за 1 ч культивирования к фагоцитарному числу за 2,5 ч культивирования.

Поскольку у всех тестов пораженности органов туберкулезной инфекцией увеличение их арифметической величины однонаправлено и означает усиление тяжести поражения, для сравнения субстанций использовали средний суммарный показатель пораженности (ССПП), составленный из суммы частных величин — коэффициента массы легких и селезенки, индекса поражения легких и высеваемости МБТ (количество КОЕ) из селезенки. Индекс эффективности лечения ИЭ (%) — долевая разница показателей тяжести течения туберкулезной инфекции в контрольных группах и в группах животных, получавших исследуемые препараты.

При оценке полученных результатов использовали параметрический тест Стьюдента — Фишера [7] и непараметрический метод Уилкоксона — Манна — Уитни [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инокуляция животным клинического изолята МБТ № 5419 СПбНИИФ вызвала клиническую картину генерализованного туберкулеза с преимущественным поражением легких. К моменту промежуточного забора через 4 недели химиотерапии в легких зараженных нелеченных животных визуализировались многочисленные сливные милиарные очаги специфического воспаления, что отражено в высоких значениях индекса поражения легких — $3,29 \pm 0,04$ усл. ед., а также среднего суммарного показателя пораженности — $44,57$ усл. ед.

Под влиянием этиотропной терапии в этот срок отмечено некоторое снижение показателей тяжести течения инфекции: коэффициента массы легких в 1,2 раза (с $1,68 \pm 0,2$ усл. ед. в контроле заражения до $1,38 \pm 0,23$), индекса поражения легких в 1,2 раза (с $3,29 \pm 0,04$ до $2,79 \pm 0,09$). Зарегистрировано также достоверное увеличение клиренса легких от МБТ (в 12,1 раз, $166,2 \pm 20,6$ КОЕ \cdot 103 против $13,75 \pm 2,3$ КОЕ \cdot 10³, $p < 0,001$). Отмечен прирост индексов эффективности по всем исследуемым показателям: по коэффициенту массы легких — + 17,9 %, по индексу поражения легких — + 15,2 %, по коэффициенту массы селезенки — + 8,5 %, по высеваемости МБТ из легких — + 91,7 %. При этом средний суммарный показатель пораженности значительно снизился (в 9,4 раза, $4,72$ усл. ед. против $44,57$ у зараженных нелеченных животных).

Уже на первом сроке лечения циклоферон в обеих используемых дозах повысил эффективность этиотропной терапии по достоверному снижению индексов поражения легких в 1,17 и в 1,2 раза соответственно ($2,38 \pm 0,13$ усл. ед., $p < 0,05$ и $2,33 \pm 0,09$ усл. ед., $p < 0,01$ против $2,79 \pm 0,09$ усл. ед. у мышей контроля лечения, прирост индекса эффективности — $+14,7\%$ и $+16,5\%$ соответственно).

В группе с назначением циклоферона в дозе 3,6 мг/кг наблюдался прирост ИЭ по коэффициенту массы легких и бактериовыделению ($+2,9$ и $+3,3\%$ соответственно). В то же время у мышей, леченных циклофероном в дозе 7,2 мг/кг, по этим параметрам ИЭ был отрицательным ($-13,8$ и $-4,0\%$ соответственно), что позволяет говорить о преимуществах применения меньшей дозы циклоферона (3,6 мг/кг) уже на этом сроке терапии.

По окончании эксперимента через 8 недель лечения у животных, получавших циклоферон, зарегистрировано достоверное уменьшение индексов поражения легких (значения составили в группе 4 — $2,05 \pm 0,11$ усл. ед. и в группе 5 — $2,15 \pm 0,21$ усл. ед. против $2,7 \pm 0,05$ усл. ед. у мышей контроля лечения, $p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно, прирост индекса эффективности — $+27,1$ и $+20,4\%$ соответственно). При бактериологическом исследовании выявлено, что циклоферон в дозе 3,6 мг/кг достоверно (в 1,6 раза) повышал клиренс МБТ из легких зараженных животных ($7,5 \pm 1,3$ КОЕ $\cdot 10^3$ против $12 \pm 0,9$ КОЕ $\cdot 10^3$ в группе контроля лечения, $p < 0,05$, ИЭ % — $+37,5\%$). На этом сроке эксперимента доза циклоферона 7,2 мг/кг также была менее эффективной. Снижение бактериологических показателей в этой группе мышей было недостоверным, ССПП — выше, чем при лечении иммуномодулятором в дозе 3,6 мг/кг (в группе 5 — $3,29$ усл. ед., в группе 4 — $2,91$ усл. ед. против $4,2$ усл. ед. в контроле лечения).

При гистологическом исследовании срезов легких, проведенном через 10,5 недель после заражения (8 недель от начала комплексной терапии), у инфицированных нелеченных мышей в легочной паренхиме выявлено большое количество свежих инфильтративных изменений. Воздушность легочной ткани практически у всех животных была снижена значительно — более чем на 50 % площади срезов. Очаги инфильтрации сливались, имели размытые границы без четкой пространственной ориентации клеток. Альвеолы и межальвеолярные перегородки в них заполнены серозным и фибринозным экссудатом и рыхло инфильтрованы лимфоцитами, крупными вакуолизированными (пенистыми) макрофагами и их скоплениями, эпителиоидными клетками, а также нейтрофильными гранулоцитами — признаками альтерации легочной ткани. В то же время в легочной ткани обнаружены и гранулемы — плотные очаги инфильтрации с четкими границами, где лимфоциты концентрически располо-

жены вокруг крупных скоплений эпителиоидных клеток. Периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты были выражены слабо.

При использовании только этиотропной терапии (контроль лечения, группа 3) выраженное снижение воздушности легочной ткани зарегистрировано в 3 из 5 случаев (60 %, против 5 из 6 в контроле заражения). Инфильтраты состояли из лимфоцитов, макрофагов (в том числе пенистых, собранных в крупные скопления), эпителиальных клеток и их скоплений, единичных нейтрофильных гранулоцитов (в 100 %), скоплений нейтрофильных гранулоцитов (в 3 случаях из 6, 50 %). Многочисленные гранулемы в легких всех мышей этой группы содержали крупные скопления эпителиоидных клеток, то есть имели преимущественно эпителиоидно-клеточный характер. Периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты стали гораздо более крупными, в то время как перибронхиальные оставались слабо выраженными.

У мышей, получавших на фоне противотуберкулезной терапии циклоферон, наблюдалось дальнейшее снижение распространенности воспалительного процесса в легких. Гистологическая картина в обеих группах животных, получавших иммуномодулятор в разных дозах (3,6 и 7,2 мг/кг), была схожей. Практически все инфильтраты были некрупными, не сливающимися, снижение воздушности легочной ткани более чем на 50 % площади среза зарегистрировано только в одном случае в группе 5 (циклоферон 7,2 мг/кг). При этом альвеолы инфильтрованы лимфоцитами, макрофагами (в том числе пенистыми, собранных в крупные скопления), эпителиальными клетками и их скоплениями. Нейтрофильных гранулоцитов (первый признак альтерации) в составе инфильтратов не обнаружено.

Гранулемы в легких мышей, леченных циклофероном, изменили свой клеточный состав: они состояли преимущественно из лимфоцитов, и только в 1 случае из каждой группы (то есть у 1 из 6 животных) лимфоциты были концентрически расположены вокруг единичных (двух или трех) эпителиоидных клеток. Следовательно, можно говорить о преимущественно лимфоидном характере гранулем (рисунок). Под влиянием циклоферона более выраженной стала лимфогистиоцитарная инфильтрация, являющаяся одним из признаков стимуляции местной иммунной реакции легких. Крупные перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты регистрировались гораздо чаще, чем в контроле лечения (в группе 4 — в 4 из 6 случаев, в группе 5 — в 5 из 6, против 1 из 6 в контроле лечения). Крупные периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты наблюдались у всех животных.

Следовательно, использование на фоне противотуберкулезных препаратов циклоферона (3,6 и 7,2 мг/кг) привело к снижению распространенности туберкулезного воспаления в легких и исчезновению альтеративного компонента воспаления. Параллельно при лече-

нии мышц отмечена активация признаков напряженности местного иммунитета легочной ткани: по изменению клеточного состава гранулем (с преимущественно эпителиоидного на преимущественно лимфоидный) и по более частому обнаружению крупных лимфогистиоцитарных инфильтратов.

Анализ особенностей фагоцитоза пМф показал, что у зараженных нелеченных мышей на фоне распространенного туберкулезного поражения легочной ткани (47-й день от момента инфицирования) развивается достоверное угнетение как поглотительной, так и переваривающей способности Мф по всем изученным показателям. Так, фагоцитарная активность снизилась в среднем до 21,4 % против 55 % у интактных мышей ($p < 0,01$), фагоцитарное число — до 3 дрожжевых клеток против 5,4 ($p < 0,01$), ПЗФ — до 35,6 дрожжевых клеток против 178 ($p < 0,01$), индекс завершенности фагоцитоза — до 2,1 усл. ед. против 3,26 ($p < 0,01$).

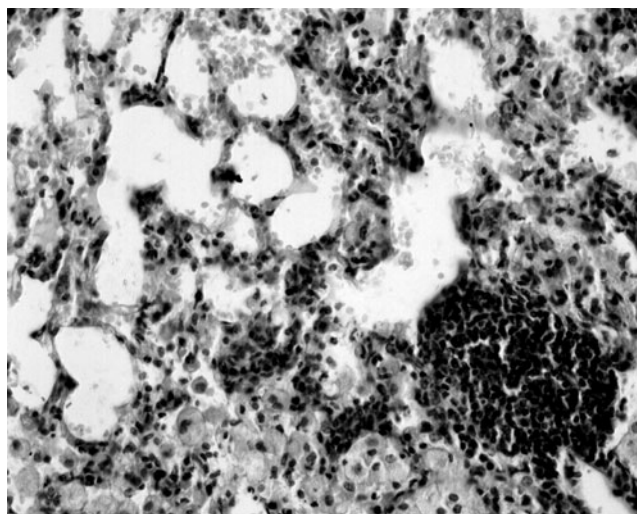
Под влиянием этиотропной терапии степень ингибирования фагоцитоза несколько уменьшилась. Через 4 недели от начала терапии у мышей группы контроля лечения отмечено достоверное повышение двух из четырех изученных показателей: фагоцитарного числа (в среднем 3,68 дрожжевых клеток против 3 в группе контроля заражения, $p < 0,05$) и показателя завершенности фагоцитоза (53,7 дрожжевых клеток против 35,6 у зараженных нелеченных мышей, $p < 0,05$).

Однако по двум другим параметрам состояния фагоцитоза показатели оставались достоверно угнетенными по сравнению с таковыми у здоровых нелеченных мышей (фагоцитарная активность — 26 % против 55 %, $p < 0,01$, индекс завершенности фагоцитоза — 2,28 усл. ед. против 3,26, $p < 0,01$) и не отличались от таковых в группе контроля заражения.

Включение циклоферона в дозе 3,6 мг/кг в терапию лекарственно устойчивого туберкулеза у мышей через 4 недели привело к восстановлению активности клеток макрофагального ряда по трем показателям: фагоцитарная активность повысилась в 2 раза (до 50,8 % против 26 % в контроле лечения, $p < 0,01$), фагоцитарное число — в 1,15 раза (до 4,22 дрожжевых клеток против 3,68 клеток, $p < 0,05$), показатель завершенности фагоцитоза — в 2,3 раза (до 123,2 дрожжевых клеток против 53,6, $p < 0,05$).

Применение циклоферона в большей дозе (7,2 мг/кг) по сравнению с контролем химиотерапии значимо повысило лишь один показатель — фагоцитарную активность (до 44,0 против 26 % в контроле лечения, $p < 0,01$) и только до 80 % от величин интактной группы. Остальные параметры оставались на уровне таковых в группе контроля лечения.

По окончании эксперимента (74-е сутки после инокуляции инфекта) у зараженных нелеченных мышей сохранялось глубокое угнетение показателей фагоцитоза пМф: фагоцитарная активность была снижена в 1,6 раза (34 % против 56 % у интактных, $p < 0,01$), фагоцитарное число — также в 1,6 раза (4,17 дрожжевых



Лимфоидная гранулема в легких мыши, инфицированной клиническим изолятом *M. tuberculosis* № 5419 СПбНИИФ, через 8 недель комплексной терапии с включением циклоферона (3,6 мг/кг). Окраска гематоксилином и эозином $\times 600$.

клеток против 6,65, $p < 0,05$), показатель завершенности фагоцитоза — в 4,7 раза (61,8 дрожжевых клеток против 287,7, $p < 0,01$), индекс завершенности фагоцитоза — в 2 раза (2,03 усл. ед. против 4,11, $p < 0,01$).

После 8-недельного курса терапии у мышей, получавших только противотуберкулезные препараты, по сравнению с 4-недельным регистрировалось дальнейшее повышение параметров фагоцитоза пМф, которое, однако, не привело к восстановлению показателей. При этом усиление фагоцитарной способности пМф наблюдалось уже по трем параметрам: фагоцитарной активности — 53,0 % против 34 %, $p < 0,01$, фагоцитарному числу — 5,02 дрожжевых клеток против 4,17, $p < 0,05$, индексу завершенности фагоцитоза — 3,13 усл. ед. против 2,03 у зараженных нелеченных животных, $p < 0,05$.

Включение циклоферона в дозе 3,6 мг/кг в базовую композицию ПТП через 8 недель привело к существенному приросту величин фагоцитарной активности пМф по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. При этом циклоферон практически полностью восстановил активность фагоцитоза, повысив его показатели до уровня интактной группы: фагоцитарную активность — в 1,3 раза до 68 % против 53 % в группе контроля полихимиотерапии, $p < 0,01$, фагоцитарное число — до 5,36 дрожжевых клеток против 5,02, ПЗФ — в 2,86 раза — до 289,2 дрожжевых клеток против 101, $p < 0,01$, и ИЗФ в 1,25 раза — до 3,92 усл. ед. против 3,13, $p = 0,05$.

Циклоферон в дозе 7,2 мг/кг, как и на первом сроке наблюдения, оказал менее выраженное действие на функцию пМф, достоверно повысив по сравнению с контролем лечения только фагоцитарную активность (60,8 % против 53,0 %, $p < 0,05$) и показатель завершенности фагоцитоза (256,8 дрожжевых клеток про-

тив 101, $p < 0,01$). При этом уровень фагоцитарного числа и индекса завершенности фагоцитоза в данной группе животных не отличался достоверно от данных группы контроля лечения.

ВЫВОДЫ

1. На модели экспериментального генерализованного лекарственно устойчивого туберкулеза циклоферон усиливает эффективность этиотропной терапии.

2. Циклоферон в дозе 3,6 мг/кг повышает эффект ПТП по коэффициенту массы легких, индексу их поражения и по бактериовыделению МБТ из легких.

3. По данным гистологического исследования использование на фоне противотуберкулезных препаратов циклоферона приводит к снижению распространенности специфического воспаления в легких и исчезновению его альтернативного компонента.

4. Циклоферон (3,6 мг/кг) оказывает восстанавливающее действие на параметры фагоцитоза, повышая

поглотительную и переваривающую способность пМф.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Е. Александрова, Б. М. Ариэль, *Пробл. туб.*, № 3, 52 – 53 (1993).
2. И. А. Васильева, А. Г. Самойлова, Т. Р. Багдасарян и др., *Туберкулез и болезни легких*, № 10, 28 – 32 (2011).
3. Т. И. Виноградова, М. Л. Витовская, Н. В. Заболотных, С. Н. Васильева, *Актуальные вопросы выявления, диагностики и лечения внелегочного туберкулеза: Науч. труды Всерос. науч.-практ. конф. СПб (2006)*, 253 – 257.
4. Е. В. Гублер, *Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов*, Ленинград (1978).
5. Л. Л. Лазаренко, А. Ю. Петров, Д. С. Суханов, М. Г. Романцов, *Врач*, № 9, 46 – 49 (2005).
6. В. В. Пунга, Л. И. Русакова, В. А. Пузанов и др., *Туберкулез и болезни легких*, № 10, 6 – 15 (2011).
7. В. Ю. Урбах, *Статистический анализ в биологических медицинских исследованиях*, Москва (1975).

Поступила 29.02.12

AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFICIENCY OF CYCLOFERON IN THE COMPLEX CHEMOTHERAPY OF GENERALIZED DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

D. S. Sukhanov, T. I. Vinogradova, S. N. Demidik, A. V. El'kin, N. V. Zabolotnykh, S. N. Vasil'eva, M. L. Vitovskaya, and M. G. Romantsov

Mechnikov North-Western State Medical University, ul. Kirochnaya 41, St. Petersburg, 191015, Russia

The results of an experimental study of the efficiency of cycloferon included in a complex chemotherapy of generalized drug-resistant mycobacterium tuberculosis (MBT) are presented. It is established that cycloferon (3.6 mg/kg) produces a significant therapeutic effect, which is manifested by an increase in the lung clearance from MBT, a decrease in the spread of specific inflammation in the lungs, and the disappearance of MBT-induced alterations. In addition, activation of the signs of tension in the local immunity of lung tissues is observed as manifested by changes in the cellular composition of granulomas and more frequent detection of large lymphocytic and macrophage infiltration. The administration of cycloferon significantly increases the absorptive and digestive activity of phagocytosis by peritoneal macrophages, which has been inhibited during the development of experimental MBT infection.

Key words: Experimental tuberculosis, drug resistance, chemotherapy, cycloferon