

ФАРМАКОЛОГИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЛЕГКИХ ПРИ ХИМИОТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННО УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

Т. И. Виноградова¹, М. Л. Витовская¹, Н. В. Заболотных¹, А. Л. Коваленко²,
Б. М. Ариэль¹, Р. А. Щеголева¹

Установлено, что ронколейкин (12,5 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, 5 инъекций через день), беталейкин (0,1 мкг/кг, внутривнутрибрюшинно, 1 раз в 3 дня (5 недель)), бестим (0,1 мкг/кг, внутривнутрибрюшинно, 10 инъекций), циклоферон (3,6 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, 3 раза в неделю (6 недель)), глутоксим (40 мг/кг, подкожно (4 недели)) и препарат янтарной кислоты ремаксол (25 мг/кг внутривнутрибрюшинно, ежедневно, 14 введений), при введении их в комплексную медикаментозную терапию экспериментального МЛУ туберкулеза у мышей оказывают положительное воздействие на регрессию воспалительного процесса в легочной ткани, стимулируют местный иммунитет легких, активируют поглотительную и переваривающую способность перитонеальных макрофагов в среднем в 1,4 и 1,9, $p < 0,05$, ингибированные самой туберкулезной инфекцией и химиотерапией.

Ключевые слова: экспериментальный лекарственно устойчивый туберкулез; мыши; иммуномодуляторы; ремаксол; процессы репарации; фагоцитоз макрофагов.

ВВЕДЕНИЕ

При лечении туберкулеза благоприятный прогноз определяется полноценным восстановлением архитектоники поврежденной легочной ткани с минимальным развитием деформирующих фиброзных изменений. Процессы заживления при туберкулезе непосредственно связаны с угнетением иммунитета: существует прямая корреляция между незавершенностью фагоцитоза с хроническим течением специфического воспаления и развитием грубых морфологических изменений в легких [10]. Несмотря на стабилизацию эпидемической ситуации по туберкулезу в последние годы, существенной динамики показателей эффективности его лечения не происходит [5]. Так, показатели клинического излечения больных туберкулезом легких составили в 2011 – 2012 гг. 34,3 и 34,9 % соответственно, что связывают, в первую очередь, с ростом регистрации множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МЛУ МБТ) с 8,7 – в 1999 г. до 24,3 на 100 тыс. населения – в 2012 г. Поэтому, наряду с внедрением новых специфических противотуберкулезных препаратов, большое значение имеет ис-

пользование фармакологических средств иммуностропной направленности [1]. Перспективными препаратами в комплексной терапии туберкулеза являются иммуномодуляторы (ронколейкин, беталейкин, бестим, глутоксим, циклоферон), а также препараты на основе янтарной кислоты (ремаксол, рунихол), эффективность которых показана в ряде доклинических и клинических исследований, проведенных в СПб НИИФ [2, 3, 4, 8].

В этой связи целью настоящего исследования явилась оценка влияния иммуномодуляторов и сукцинат-содержащего препарата ремаксол при их включении в комплексную этиотропную терапию на репаративные процессы в легочной ткани при лекарственно устойчивом туберкулезе у мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный туберкулез моделировали у 710 половозрелых белых нелинейных мышей-самцов (питомник “Рапполово” РАМН, Санкт-Петербург) путем инокуляции в хвостовую вену суспензии (1×10^7 КОЕ/0,2 мл) штамма МБТ №5419 из коллекции СПб НИИФ с резистентностью к изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этионамиду (30 мкг/мл), а также с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к рифампицину – в гене *rpoB*: Asp516→Tyr и к изониазиду – в гене *katG*: Ser315→Thr. Проведено 6 серий экспериментов, в каждой из которых присутствовали груп-

¹ ФГБУ “СПб НИИФ” Минздрава России; Лаборатория экспериментального туберкулеза и новых медицинских технологий (зав. – проф. Т. И. Виноградова) ФГБУ “Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии” Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2 – 4

² ФМБА ФГБУН “Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства”, г. Санкт-Петербург

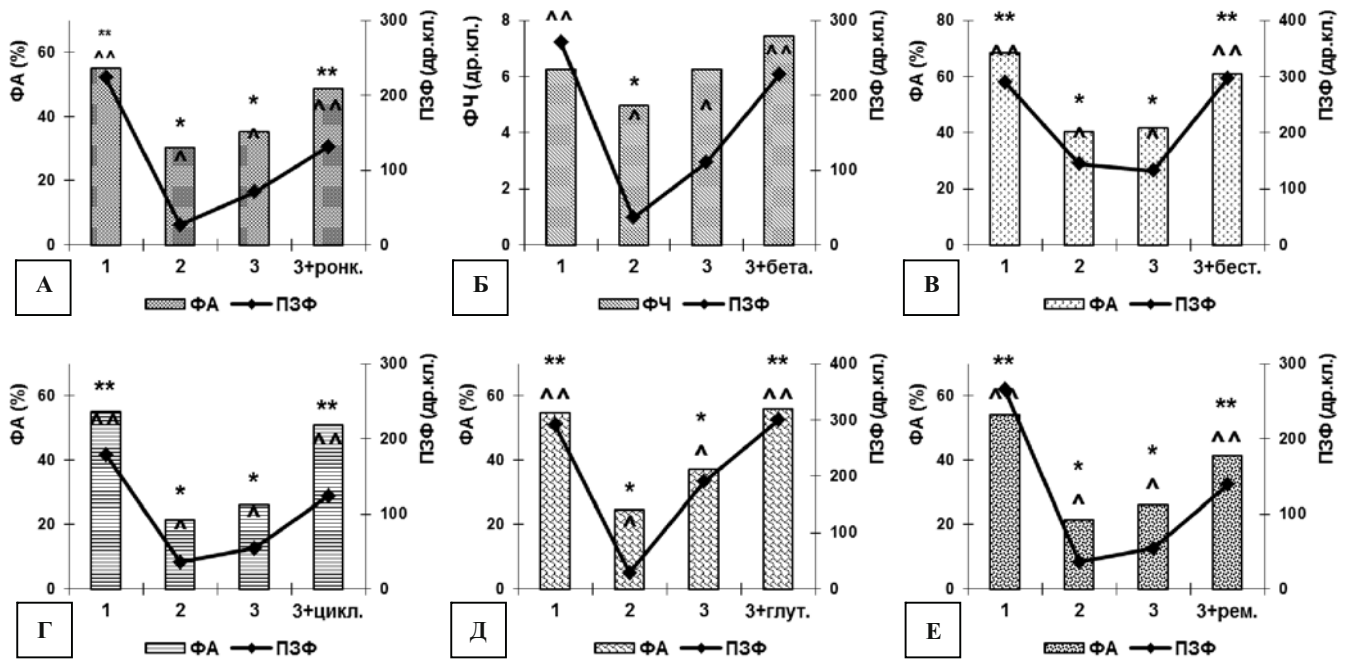


Рис. 1. Влияние иммуностропных препаратов на величину показателей эффективности фагоцитоза перитонеальных макрофагов мышей с МЛУ туберкулезом:

1 – показатели у интактных мышей; 2 – нелеченый МЛУ туберкулез; 3 – стандартная специфическая противотуберулезная терапия;

А. Ронколейкин (в дозе 12,5 мг/кг, внутривбрюшинно, 5 инъекций через день); Б. Беталейкин (0,1 мг/кг, внутривбрюшинно, 1 раз в 3 дня (5 недель));

В. Бестим (0,1 мг/кг, внутривбрюшинно, 10 инъекций); Г. Циклоферон (3,6 мг/кг, внутривбрюшинно, 3 раза в неделю (6 недель)); Д. Глутоксим

(40 мг/кг, подкожно (4 недели)); Е. Ремаксол (25 мг/кг внутривбрюшинно, ежедневно, 14 введений)

* – достоверность значений ФА (А, В, Г, Д, Е) и ФЧ (Б) по сравнению с интактными группами;

** – достоверность значений ФА (А, В, Г, Д, Е) и ФЧ (Б) по сравнению с группами контроля лечения; ^ – достоверность значений ПЗФ по сравнению с интактными группами; ^^ – достоверность значений ПЗФ по сравнению с группами контроля лечения.

пы контроля заражения (зараженные нелеченные, $n = 70$), а также интактных мышей (здоровые незараженные, $n = 60$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и пище. Лечение мышей в подопытных группах начинали при обнаружении в легких очагов специфического воспаления (14–18 день от заражения). Группы контроля получали только противотуберкулезные препараты: изониазид (Н), 25 мг/кг, и амикацин (А), 30 мг/кг, подкожно; этамбутол (Е), 50 мг/кг, и левофлоксацин (Fq), 20 мг/кг, внутривбрюшинно. Обоснованием к применению Н в химиотерапии туберкулеза с МЛУ МТБ явились собственные данные [1], а также данные Dooley K. E. et al. [9], согласно которым препарат в дозе 25 мг/кг проявляет бактерицидное действие в отношении *katG*-мутантных штаммов МБТ. В остальных опытных группах химиотерапия была дополнена иммуномодуляторами: ронколейкин (серия 1) – в дозе 12,5 мг/кг, внутривбрюшинно, 5 инъекций через день (Интерлейкин-2, раствор для инъекций, ООО “БИОТЕХ”, Санкт-Петербург); беталейкин (серия 2) – 0,1 мг/кг, внутривбрюшинно, 1 раз в 3 дня (5 недель) (Интерлейкин-1 бета, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и подкожного введения, “Государственный НИИ особо чистых препаратов”;

бестим (серия 3) – 0,1 мг/кг, внутривбрюшинно, 10 инъекций (лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения, “Государственный НИИ особо чистых препаратов”); циклоферон (серия 4) – 3,6 мг/кг, внутривбрюшинно, 3 раза в неделю (6 недель) (Меглюмина акридонацетат, раствор для внутривенного и внутримышечного введения, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”), глутоксим (серия 5) – 40 мг/кг, подкожно (4 недели) (Глутамил-Цистеинил-Глицин динатрия, раствор для инъекций, ЗАО “ФАРМА ВАМ”). Животные серии 6 получали ремаксол (препарат янтарной кислоты) в дозе 25 мг/кг внутривбрюшинно, ежедневно, 14 введений (раствор для инфузий, ООО “НТФФ “ПОЛИСАН”). Мышей выводили из опыта через 8 недель от начала терапии.

Животных выводили из опыта декапитацией с помощью гильотины через 8 недель от начала комплексной этиотропной терапии согласно требованиям гуманного обращения с экспериментальными животными, утвержденными комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными исследовательской организации в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, Директивой Совета ЕЭС и рекомендациями FELASA Working Group

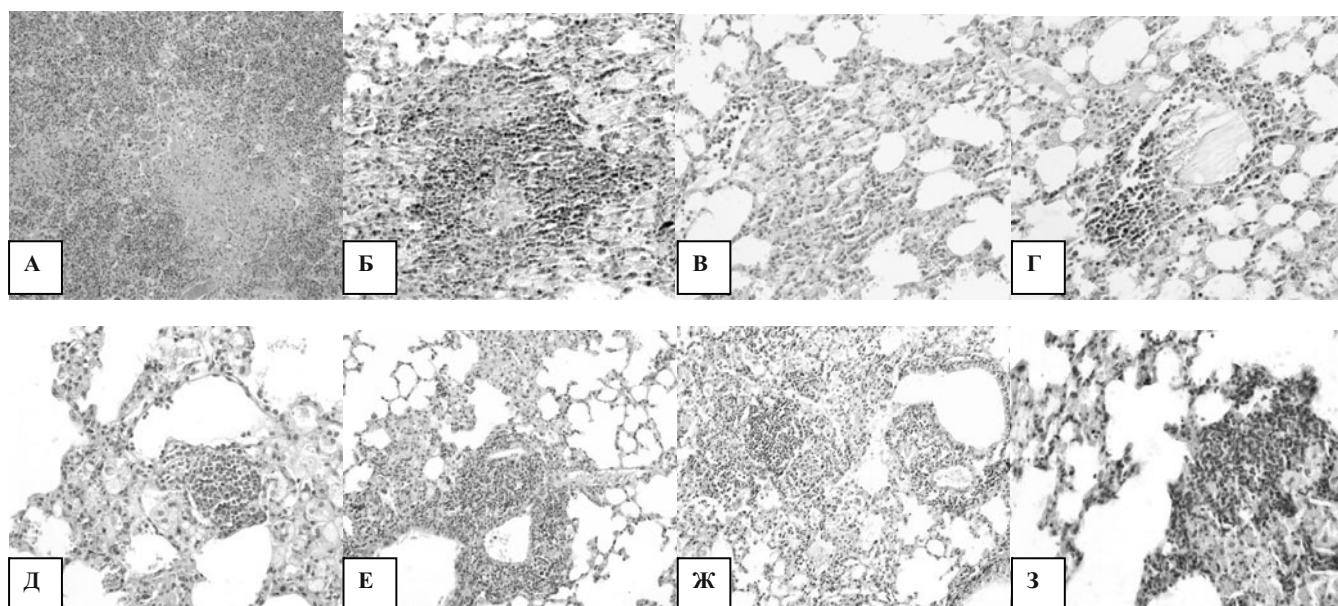


Рис. 2. Гистологические препараты легких мышей контрольных и опытных групп, отражающие распространенность специфического поражения при экспериментальном лекарственно устойчивом туберкулезе. Окраска гематоксилином и эозином.

А. Легкое мыши группы контроля заражения. Сливные очаги специфической инфильтрации без четкой пространственной ориентации клеток, с очагами сформированного некроза, $\times 300$.

Б. Легкое мыши группы контроля лечения. Специфический инфильтрат, содержащий крупные сливающиеся эпителиоидные гранулемы, $\times 300$.

В. Небольшой специфический инфильтрат в легком мыши после курса противотуберкулезных препаратов и ронколейкина. Воздушность легочной ткани сохранена, $\times 600$.

Г. Лимфогистиоцитарный инфильтрат периваскулярной локализации в легком мыши после курса противотуберкулезных препаратов и бестима, $\times 600$.

Д. Лимфоидная гранулема в ткани легких мыши после курса противотуберкулезных препаратов и бестима. В очаге специфической инфильтрации большое количество пенистых макрофагов, $\times 600$.

Е. Крупные периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты в легких мыши после курса противотуберкулезных препаратов и циклоферона, $\times 300$.

Ж. Преимущественно лимфоидная гранулема в ткани легких мыши после курса противотуберкулезных препаратов и глутоксима, $\times 300$.

З. Небольшой очаг специфической инфильтрации в ткани легких мыши после курса противотуберкулезных препаратов и ремаксола. Воздушность легочной ткани сохранена, $\times 600$.

Report. Определяли эффективность фагоцитоза перитонеальных макрофагов (пМф) в отношении опсонизированных дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 клеток) по 4 параметрам: фагоцитарная активность (ФА, %); фагоцитарное число (ФЧ) и показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) – по количеству дрожжевых клеток (др. кл.); индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ), усл. ед. Фагоцитарную активность пМф мышей исследовали по стандартной методике. Перитонеальные макрофаги (пМф) получали промыванием брюшной полости мышей средой 199 с 10% сывороткой крупного рогатого скота и 5 ед/мл гепарина, клеточную взвесь пМф (1×10^6 клеток) помещали на пластиковые одноразовые чашки Петри, инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 1 ч в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . После удаления не прикрепившихся клеток к монослою пМф добавляли взвесь дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 клеток на 1 чашку), предварительно опсонизированных сывороткой мышей, инкубировали в течение 1 и 2,5 ч, двукратно отмывали, фиксировали 70% этанолом, окрашивали гематоксилином и эозином. Результаты фиксировали под микроскопом при увеличении $\times 80$.

Определяли следующие показатели:

$$\text{ФА (\%)} = \frac{\text{число пМф, вовлеченных в фагоцитоз}}{\text{число сосчитанных пМф}} \cdot 100;$$

$$\text{ФЧ} = \frac{\text{число фагоцитированных дрожжевых клеток}}{\text{число фагоцитирующих пМф}};$$

ПЗФ – число дрожжевых клеток, переваренных пМф за 1,5 ч инкубации;

$$\text{ИЗФ} = \frac{\text{ФЧ за 1 ч инкубации}}{\text{ФЧ за 2,5 ч инкубации}}.$$

Гистологическое исследование легких проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, при увеличении $\times 300$, $\times 600$ и $\times 1500$ с помощью эргономичного микроскопа “Olympus BX45”, снабженного программным обеспечением “Olympus DP-Soft”.

Результаты статистически обработаны с использованием непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни и Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В различных сериях экспериментов в группах контроля заражения исследование функциональной активности пМф выявило достоверное угнетение эффективности фагоцитоза: параметры поглотительной способности макрофагов были снижены по сравнению с интактным контролем в 1,3 – 2,9 раза ($p < 0,05$), переваривающей – в 1,6 – 10,1 раза ($p < 0,01$). При морфологической оценке легких отмечали обширные сливающиеся очаги инфильтрации с размытыми границами без четкой пространственной ориентации клеток. Воздушность легочной ткани была снижена более чем на 30 % площади среза, в 100 % случаев обнаружены сформировавшиеся очаги некроза. На фоне серозно-фибринозной экссудации наблюдалась инфильтрация альвеол и межальвеолярных перегородок лимфоцитами, макрофагами и эпителиоидными клетками, а также определялись крупные скопления распадающихся нейтрофильных гранулоцитов. В гранулемах скопления эпителиоидных клеток были очень крупными, лимфоциты же образовывали лишь узкое кольцо по периферии. Лимфогистиоцитарная инфильтрация была выражена очень слабо.

Этиотропная терапия в группах контроля лечения несколько уменьшила подавление фагоцитоза. Однако ни по одному параметру восстановление фагоцитарной функции не зарегистрировано: показатели поглотительной и переваривающей способности пМф были значимо снижены по сравнению с интактной группой (в 1,3 – 7,8 раза, $p < 0,05$). При гистологической оценке результатов этиотропной терапии выявлено, что, несмотря на существенное сокращение распространенности туберкулезного поражения и исчезновение сливного характера очагов, в половине наблюдений сохранялись резко выраженные экссудативно-некротические изменения и значительное снижение воздушности легочной ткани. В остальных случаях регистрировали отдельные мелкие инфильтраты, в которых преобладали лимфоциты, макрофаги и эпителиоидные клетки, а сформированных некротических фокусов не найдено. Единичные нейтрофильные гранулоциты и их скопления, как и эпителиоидные гранулемы, встречались реже (в 66,7 % случаев). Отмечена большая выраженность лимфогистиоцитарной инфильтрации, в основном, периваскулярной, и незначительная – перибронхиальной.

Все исследованные иммуностропные препараты достоверно стимулировали поглотительную и переваривающую способность пМф, ингибированные самой туберкулезной инфекцией и химиотерапией (рис. 1). Так, ронколейкин, бестим, глутоксим и ремаксол способствовали достоверному повышению как поглотительной активности пМф в 1,2 – 1,6 раза ($p < 0,05$), так и переваривающей – в 1,3 – 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной терапией. Циклоферон стимулировал фагоцитарную активность пМф в 1,4 раза

($p < 0,05$), показатель завершенности фагоцитоза – в 2,3 раза ($p < 0,05$). Беталейкин достоверно усиливал переваривающую способность пМф в 1,7 – 2,1 раза ($p < 0,01$).

Морфологическое исследование легких мышей опытных групп показало, что иммуностропные препараты, имеющие различный механизм действия, ускорили регрессию туберкулезного воспаления (рис.2). Так, снижение воздушности легочной ткани более чем на 30 % площади среза регистрировалось значительно реже, чем в группах контроля лечения (от 0 до 33,3 % наблюдений против 50 %), а специфическое воспаление было представлено преимущественно отдельными мелкими инфильтратами. Крупные сливные очаги визуализировались значительно реже – от 0 до 33,3 % случаев. Изменился и клеточный состав очагов специфического воспаления: превалировали лимфоциты, крупные пенистые макрофаги и эпителиоидные клетки, а единичные нейтрофильные гранулоциты и их скопления находили в 5,3 раза реже, чем в контроле лечения ($p < 0,02$). В гранулемах наблюдалось снижение экссудации: преимущественно эпителиоидно-клеточные гранулемы визуализировали в 3 – 6 раз реже, чем при этиотропной терапии ($p < 0,05$), а у мышей, получавших ронколейкин и ремаксол, такие гранулемы не обнаружены. Необходимо отметить более частое обнаружение лимфоидных гранул (в 50 – 100 % наблюдений), которые в контроле либо отсутствовали, либо выявлялись чрезвычайно редко – в 16,7 % случаев. Значительно более выраженной и распространенной стала лимфогистиоцитарная инфильтрация – один из признаков стимуляции местной иммунной реакции легких. Крупные периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты регистрировались в 1,2 – 5,0 раз чаще, чем в контроле лечения, перибронхиальные – в 50 – 100 % случаев (при их отсутствии в контроле лечения, $p < 0,01$).

При экспериментальном лекарственно устойчивом туберкулезе исследованные иммуномодуляторы (ронколейкин, беталейкин, бестим, циклоферон, глутоксим) и сукцинатсодержащий препарат ремаксол способствуют восстановлению поглотительной и переваривающей способности перитонеальных макрофагов, отражающих активность системы мононуклеарных фагоцитов в целом, и снижают распространенность специфического процесса, тем самым нивелируя признаки альтерации легочной ткани. Кроме того, они активизируют, что является еще более важным, продуктивный компонент специфического воспаления, меняя клеточный состав гранул с преимущественно эпителиоидного на преимущественно лимфоидный, а также стимулируют местный иммунитет легких, усиливая лимфогистиоцитарную инфильтрацию. В этом отношении исследованные нами патогенетические препараты при экспериментальном туберкулезе действуют так же, как естественные иммунокорректоры при благоприятном течении туберкулеза у человека. Как было

показано А. И. Струковым и И. П. Соловьевой [7], в таком случае развивается картина преимущественно продуктивного воспаления, и приходит в движение вся физиологическая система соединительной ткани, причем пролиферативная реакция служит показателем активации клеточного иммунитета. При этом число возбудителей в воспалительных очагах уменьшается. Учитывая результаты наших наблюдений, это происходит, видимо, вследствие завершеного фагоцитоза микобактерий макрофагами. Наши наблюдения согласуются с представлениями ведущих патологоанатомов, согласно которым пролиферативная реакция является показателем и в известной мере индикатором активации иммунитета [7]. Учитывая результаты, полученные при изучении противотуберкулезного иммунитета у человека [6], наши данные, как полагаем, должны привлечь внимание врачей-фтизиатров и способствовать широкому применению иммуномодуляторов и сукцинатсодержащих препаратов для лечения больных МЛУ туберкулезом.

ВЫВОДЫ

1. В условиях экспериментальной химиотерапии лекарственно устойчивого туберкулеза, несмотря на существенное сокращение распространенности туберкулезного поражения и исчезновение сливного характера очагов, в легочной ткани сохраняются резко выраженные экссудативно-некротические изменения и значительное снижение воздушности, а показатели погложительной и переваривающей способности перитонеальных макрофагов остаются значимо сниженными.

2. Ронколейкин, беталейкин, бестим, циклоферон, глутоксим и препарат янтарной кислоты ремаксол при

введении их в комплексную медикаментозную терапию экспериментального МЛУ туберкулеза у мышей вызывают положительное воздействие на регрессию воспалительного процесса в легочной ткани, стимулируют местный иммунитет легких, активируют погложительную и переваривающую способность перитонеальных макрофагов в среднем в 1,4 и 1,9, $p < 0,05$, ингибированные самой туберкулезной инфекцией и химиотерапией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. И. Виноградова, Н. В. Заболотных, С. Н. Васильева и др. *Пермский мед. ж.*, № 1, 88 – 93 (2011).
2. Т. И. Виноградова, Д. С. Суханов, Н. В. Заболотных и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, 74(2), 34 – 38 (2011).
3. Н. В. Заболотных, Т. И. Виноградова, *Мед. иммунология*, 4(2), 122 (2002).
4. Н. В. Заболотных, Т. И. Виноградова, Л. А. Скворцова и др. *Бестим в комплексной терапии туберкулеза легких*, Ю. Н. Левашев, А. С. Симбирцев (ред.), Санкт-Петербург (2007).
5. О. Б. Нечаева, Е. И. Скачкова, Д. А., *Туберкулез и болезни легких*, № 12, 40 – 49 (2013).
6. И. Я. Сахарова, Б. М. Ариэль, Б. И. Кноринг и др., *Пробл. туберкулеза*, № 12, 22 – 27 (2008).
7. А. И. Струков, И. П. Соловьева, *Морфология туберкулеза в современных условиях*, Москва (1986).
8. Д. С. Суханов, Т. И. Виноградова, С. Н. Демидик и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, 75(9), 32 – 37 (2012).
9. К. Е. Dooley, D. M. Carole, M. N. DeGroot, et al., *Clin. Infect. Dis.*, 55(4), 572 – 581 (2012).
10. J. A. Lorenzo, *J. Clin. Invest.*, 106, 749 – 752 (2000).

Поступила 25.06.14

THE INFLUENCE OF IMMUNOTROPIC DRUGS ON REPARATIVE PROCESSES IN THE LUNGS EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS

T. I. Vinogradova¹, M. L. Vitovskaya¹, N. V. Zabolotnykh¹, A. L. Kovalenko², B. M. Ariél¹, R. A. Shchegoleva¹

¹ The Saint-Petersburg research Institute of Phthisiopulmonology

² Institute of toxicology of the Federal medical-biological Agency

It is revealed that Roncoleukin (12.5 mg/kg, intraperitoneally, 5 injections a day), Betaleukin (0.1 mg/kg, intraperitoneally, 1 time in 3 days (5 weeks)), Bestim (0.1 mg/kg, intraperitoneally, 10 injections), cycloferon (3.6 mg/kg, intraperitoneally, 3 times a week for 6 weeks), Glutoxim (40 mg/kg subcutaneously (4 weeks)) and the preparation of succinic acid remaxol (at a dose of 25 mg/kg intraperitoneally, daily 14 introduction), when you enter them in a comprehensive drug therapy pilot MDR tuberculosis in mice produce a positive effect on the regression of inflammation in the lung tissue, stimulate local immunity of the lungs, activate and digestive absorption capacity of peritoneal macrophages an average of 1.4 and 1.9, $p < 0.05$, inhibited the tuberculosis infection and chemotherapy.

Key words: experimental drug resistant tuberculosis; mouse; immunomodulators; remaxol; reparation processes; macrophage phagocytosis.