

# Влияние глутоксима на рост лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза при его сочетании с противотуберкулезными препаратами второго ряда в культуре легочной ткани мышей

А. Д. КУНИЧАН, Г. Б. СОКОЛОВА, М. И. ПЕРЕЛЬМАН

НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова, Москва

## Glutoxim Effect on Multi-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in the Combination with Antituberculosis Drugs of Second Line on the Murine Lung Tissue Culture

A. D. KUNICHAN, G. B. SOKOLOVA, M. I. PERELMAN

Research Institute of Phthiisopulmonology, I.M.Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

Показано, что сочетание глутоксима с препаратами второго ряда для лечения туберкулеза (циклосерин+рифабутин, цикloserин+протионамид) приводило к статистически значимому снижению внутриклеточного роста микобактерий в культуре легочной ткани. По сравнению с контролем отмечено снижение роста в 3–5 раз. Изученный штамм *Mycobacterium tuberculosis* был выделен от больного и характеризовался множественной лекарственной устойчивостью. Сочетание препаратов второго ряда с глутоксимом способствовало также снижению роста микроколоний лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза в культуре легочной ткани. Дополнение глутоксимом препаратов второго ряда обеспечивало жизнеспособность и функциональную активность клеточных элементов легочной ткани.

*Ключевые слова:* глутоксим, лекарственноустойчивые микобактерий туберкулеза, культура легочной ткани мышей.

It was demonstrated that glutoxim combination with second line drugs for tuberculosis treatment (cycloserine+rifabutine, cycloserine+protionamide) provided statistically significant decrease of intracellular mycobacteria growth in the murine lung tissue culture. The decrease rate when compared to the control group was 3–5 times. The investigated *Mycobacterium tuberculosis* strain was isolated from the patient and was multi-drug resistant (MDR). Glutoxim addition to the second line drugs combinations provided also decrease of the MDR bacteria microcolonies growth in the lung tissue culture. Glutoxim combination with second line antituberculosis drugs allowed to keep vitality and functional activity of lung tissue cells.

*Key words:* glutoxim, multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, murine lung tissue culture.

Увеличение частоты случаев туберкулеза, резистентного к основным противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и др.), привело к широкому применению препаратов второй линии (циклосерин, рифабутин, протионамид, фторхинолоны и др.). Большинство из них значительно уступает по своей антибактериальной активности препаратам первой линии. Поэтому поиск возможностей усиления их активности, особенно в отношении внутриклеточно расположенных микобактерий, является актуальной проблемой фтизиатрии.

Одной из таких возможностей является усиление активности клеточных элементов макрофагального ряда, которое способствовало бы более эффективному разрушению лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза как за счет действия препаратов второй линии, так и за

счет повышения фагоцитарной активности макрофагов.

Проведенные недавно исследования сочетаний препаратов первой линии (изониазида, рифампицина, пиперазина), к которым имела устойчивость микобактерий туберкулеза, с глутоксимом (представитель нового класса лекарственных веществ — триопозтинов) показали, что глутоксим способен значительно усилить их действие на внутриклеточно расположенные микобактерий.

С учетом этого опыта была поставлена цель — повысить эффективность ряда препаратов второго ряда (циклосерин, рифабутин, протионамид) при их сочетанном применении в отношении лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза (ЛРМБТ) за счет использования глутоксима в качестве стимулятора макрофагальной активности.

Задачи исследования:

- проведение сравнительной оценки действия комбинаций цикloserин+рифабутин и цикloserин

© Коллектив авторов, 2002

Адрес для корреспонденции: 127994 Москва, ул. Достоевского, 4. НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова

**Таблица 1. Влияние противотуберкулезных препаратов второй линии в сочетании с глутоксимом и без него на рост лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза в культуре легочной ткани мышей**

№ группы	Сочетания препаратов (мкг/мл)	Количество выросших микроколоний ЛРМБТ на 100 полей зрения ( $M \pm m$ )		Достоверность различий
		ВНУ*	ВНЕ*	
1-я	Контроль (без препаратов)	973±20,0	1059±20,7	
2-я	цикloserин 12,5+ рифабутин 40,0	222,2±17,4	253,4±34,9	$P_{2-3} \text{ВНУ} < 0,001$ $P_{2-3} \text{ВНЕ} > 0,1$
3-я	Цикloserин 12,5+ рифабутин 40,0+ глутоксим 1,0	79,6±5,3	239,7±17,0	$P_{4-5} \text{ВНУ} < 0,001$ $P_{4-5} \text{ВНЕ} > 0,1$ $P_{35} \text{ВНУ-ВНЕ} < 0,001$ $P_{2,4} \text{ВНУ-ВНЕ} > 0,05-0,1$ $P_{2-4} < 0,001$
4-я	Цикloserин 12,5+ протионамидОД	54,9±2,8	60,3±4,8	
5-я	Цикloserин 12,5+ протионамид 0,1 + глутоксим 1,0	10,1±1,2	54,2±8,5	

**Примечание:** Здесь и в табл. 2. ВНУ — число внутриклеточно расположенных бактерий; ВНЕ — число внеклеточно расположенных бактерий.

рин+рифабутин+глутоксим на рост ЛРМБТ в культуре легочной ткани;

2. проведение сравнительной оценки действия комбинаций цикloserин+протионамид и цикloserин+протионамид+глутоксим на рост ЛРМБТ в культуре легочной ткани;

3. изучение изменения морфокинетических характеристик клеточных элементов культуры легочной ткани под влиянием указанных комбинаций препаратов.

## Материал и методы

Исследование проведено в 48 камерах с культурой легочной ткани мышей F1 линий СВАхС57Ы6. Использовали методику эксплантации в собственной модификации [1, 2]. Кусочки легочной ткани (эксплантаты) помещали на покровное стекло фторопластовых перфузионных камер и фиксировали тонким слоем плазмы крови кролика. В камеры заливали питательную среду 199 с 10% сыворотки крупного рогатого скота, далее их герметизировали и помещали в термостат при температуре 37 °С на 6 дней. На 6-й день, когда выселение и рост клеточных элементов в периексплантатной зоне достигали максимума, в камеры путем перфузии вводили свежую питательную среду с препаратами и ЛРМБТ. В контрольные камеры вводили только свежую питательную среду без препаратов.

Лекарственнорезистентные микобактерии туберкулеза получали от больного туберкулезом в микробиологической лаборатории института. Устойчивость ЛРМБТ отмечалась к изониазиду (1 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл) и стрептомицину (50 мкг/мл).

Препараты вводили в следующих концентрациях: цикloserин 12,5 мкг/мл (суббактериостатическая концентрация), рифабутин 40 мкг/мл, протионамид 0,1 мкг/мл (суббактериостатическая концентрация), глутоксим 1,0 мкг/мл (примерно соответствует дозе препарата для человека). Суббактериостатические концентрации цикloserина и протионамида были необходимы для того, чтобы не подавить полностью рост микобактерий.

В соответствии с поставленными задачами камеры с культурой ткани были разделены на 5 групп:

1-я группа — контроль без препаратов;

2-я группа — цикloserин+рифабутин;

3-я группа — цикloserин+рифабутин + глутоксим;

4-я группа — цикloserин+протионамид;

5-я группа — цикloserин+протионамид+глутоксим.

Наблюдение за выселением, ростом и поведением клеточных элементов, за ростом микроколоний ЛРМБТ и проведение подсчета числа и размеров микроколоний вели путем фазово-контрастной микроскопии с помощью отечественного микроскопа МБИ-13 (ЛОМО, Россия).

Количество выросших микроколоний ЛРМБТ определяли в 100 полях зрения в каждой камере на 6-8-й дни после заражения культуры ткани, т. е. к тому времени, когда еще возможен был их подсчет в контрольных камерах без препаратов. Дальнейшее культивирование приводило к переплетению растущих в виде «кос» микроколоний и их подсчет становился невозможным. Размер микроколоний оценивали микрометрически с применением микрометрической линейки и сетки Г. Г. Автандилова, учитывая длину «кос» в микрометрах (мкм) [3].

Полученные количественные показатели подвергали компьютерной статистической обработке по программе «Статистика».

## Результаты исследований

Данные о количестве выросших микроколоний ЛРМБТ в камерах с культурой легочной ткани представлены в табл. 1.

Из таблицы видно, что использование сочетания цикloserин+рифабутин привело к значительному снижению числа выросших микроколоний ЛРМБТ по сравнению с контролем ( $P < 0,01$ ). Однако их количество в клеточной среде (ВНУ) статистически не отличалось от такового за пределами клеточного массива (ВНЕ). Добавление глутоксима к этому сочетанию препаратов привело к резкому уменьшению числа микроколоний ЛРМБТ в зоне выселения и роста клеточных элементов — примерно в 3 раза по сравне-

**Таблица 2. Средний размер микроколоний ЛРМБТ при воздействии противотуберкулезных препаратов второй линии в сочетании с глутоксимом и без него.**

№ группы	Сочетания препаратов (мкг/мл)	Количество выросших микроколоний ЛРМБТ на 100 полей зрения (М4-т)		Достоверность различий
		ВНУ*	ВНЕ*	
1.	Контроль (без препаратов)	239+28,3	267,7+34,3	
2.	Циклосерин 12,5+ рифабутин 40,0	196,3+29,7	208,3+19,7	$P_{1,2,4} \text{ВНУ-ВНЕ} > 0,1$ $P_{3,5} \text{ВНУ-ВНЕ} < 0,005-0,001$
3.	Циклосерин 12,5+ рифабутин 40,0+ глутоксим 1,0	65,9+13,7	186,3+23,3	$P_{2,3} \text{ВНУ} < 0,001$ $P_{4,5} \text{ВНУ} < 0,005$ $P_{2-1} \text{ВНЕ} > 0,1$ $P_{4-5} \text{ВНЕ} > 0,1$
4.	Циклосерин 12,5+ протионамид 0,1	39,6+7,3	43,7+8,2	
5.	Циклосерин 12,5+ протионамид 0,1+ глутоксим 1,0	19,4+3,7	38,7+5,3	

нию с таковым в бесклеточном пространстве. За пределами этой зоны количество выросших микроколоний ЛРМБТ было практически таким же, как и при использовании сочетания двух препаратов без глутоксима.

Сочетание циклосерина с протионамидом оказалось более активным, чем сочетание циклосерина с рифабутином ( $P < 0,001$ ). Однако как и в случае применения сочетания циклосерин+рифабутин, разница между числом микроколоний ЛРМБТ в зоне клеточного массива и за ее пределами статистически была недостоверной ( $P > 0,05$ ). Эта картина значительно изменилась при добавлении глутоксима к сочетанию циклосерина и протионамида. Количество микроколоний ЛРМБТ, выросших в области клеточного массива, уменьшилось примерно в 5 раз по сравнению с таковым при отсутствии глутоксима, тогда как в бесклеточном пространстве рост микобактерий туберкулеза не отличался достоверно от их роста при использовании сочетания циклосерин+протионамид.

Интенсивность роста ЛРМБТ косвенно отражалась в размере выросших микроколоний. Данные, свидетельствующие об этом, представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что под влиянием глутоксима интенсивность роста микроколоний ЛРМБТ в клеточной среде снижается по сравнению с таковой во внеклеточной среде. Дополнение глутоксимом сочетания циклосерин+рифабутин привело к уменьшению среднего размера микроколоний в клеточной среде через 7 дней после заражения культуры ткани и введения препаратов примерно в 3 раза по сравнению с их размером при отсутствии глутоксима. При сочетании глутоксима с циклосерином и протионамидом уменьшился в 2 раза размер микроколоний ЛРМБТ.

В присутствии глутоксима отмечалось сохранение жизнеспособности клеточных элементов культуры ткани, особенно заметное при использовании его в сочетании с циклосерином и рифабутином. К 7-мудню после заражения культуры ткани и введения циклосерина и рифабутина клеточные элементы (макрофаги, фибробласты) прекращали амeboидное движение, округлялись, в их цитоплазме накапливали грубые комковатые структуры. Из макрофагов прорастали «косы» ЛРМБТ. В присутствии этих же препаратов и глутоксима клеточные элементы сохраняли обычную для них подвижность и морфологическую характеристику (Рис. 3). В контрольных камерах отмечалось полное разрушение клеток легочной ткани и рост многочисленных микроколоний ЛРМБТ.

## Выводы

1. Присоединение глутоксима к сочетаниям противотуберкулезных препаратов второго ряда (циклосерин+рифабутин, циклосерин+протионамид) приводит к достоверному уменьшению внутриклеточного роста лекарственнорезистентных микобактерий туберкулеза в культуре легочной ткани, по сравнению с таковым при отсутствии глутоксима — в 3 и в 5 раз соответственно.

2. Глутоксим при его сочетании с препаратами второго ряда снижает интенсивность роста микроколоний ЛРМБТ культуры легочной ткани в 2—3 раза.

3. Глутоксим в сочетании с противотуберкулезными препаратами второго ряда способствует сохранению жизнеспособности и функциональной активности клеточных элементов легочной ткани.

## ЛИТЕРАТУРА

*Куничан А. Д., Можокина Г. Н., Соколова Г. Б.* Действие препарата фторхинолонового ряда на клеточные элементы легочной ткани. II Россе Коигр «Человек и лекарство», 10-15 апреля; М.: 1995: 186.

*Соколова Г. Б., Куничан А. Д., Можокина Г. Н. и др.* Морфокиистина клеток легочной ткани в условиях лекарственной герации туберкулеза легких. Патоморфология органов и систем. Типовые патологические процессы. I съезд патофизиологов. М.: 1996: 268.

*Соколова Г. Б.* Индивидуализированная терапия туберкулеза легких (экспериментально-клиническое исследование). Автореф лисе на соиск уч степ докт мед наук. М.: 2000; 97.

Поступила 14. 05. 02