

Засеант
На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВА СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ГЛУТОКСИМА В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА СОПРОВОЖДЕНИЯ
ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА**

14.00.26 -фтизиатрия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

**Санкт-Петербург
2004**

Диссертация выполнена в Государственном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научный руководитель:	доктор медицинских наук Виноградова Татьяна Ивановна
Научный консультант	доктор медицинских наук Вишневский Борис Израилевич
Официальные оппоненты:	доктор медицинских наук, профессор Браженко Николай Андреевич доктор медицинских наук, профессор Греймер Мария Сергеевна
Ведущая организация:	Российский Государственный медицинский университет.

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.092.01 при Государственном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации» (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. 279-25-84)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Государственного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации» (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4, тел. 279-25-84)

Автореферат разослан «___» _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Т.И. Виноградова

Актуальность проблемы. В начале третьего тысячелетия туберкулез продолжает причинять человечеству колоссальный экономический и биологический ущерб (Шевченко Ю.Л., 2000; Покровский В.И., 2001; Левашев Ю.Н., 2003; Davey S., 2001). Сохранение эпидемической напряженности по туберкулезу как в России, так и во всем мире является результатом сочетанного влияния феномена лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) и повсеместного ее распространения угрожающими темпами, а также экологических, социальных и экономических факторов, приведших к росту иммунодефицитных заболеваний различного генеза (Покровский В.И., 2000; Хрулева Т.С., 2001; Чуканов В.И., 2001; Онищенко Г.Г., 2003; Вишневский Б.И., 2003; Iseman M., 1998). В результате резко изменилось течение туберкулезной инфекции и структура клинических форм, возросла частота диссеминированных процессов, инфильтративных и казеозных пневмоний, участились случаи (до 72,3%) прогрессирующего течения туберкулеза с острым началом и массивным бактериовыделением (Хоменко А.Г., 1999; Ерохин В.В., 2000; Соколова Г.Б. и др., 2000; Иванова Л.А. и др., 2001; Мишин В.Ю., 2001; Ариэль Б.М., 2003).

В современных условиях полирезистентность МБТ и дефекты иммунной системы выделены в качестве неустраняемых и наиболее значимых причин терапевтических неудач (Иванова Л.А., 1995). В настоящее время во фтизиатрии для лечения полирезистентных форм туберкулеза легких используют массивную этиотропную терапию, что создает чрезмерную медикаментозную нагрузку и повышает риск развития побочных реакций со стороны различных органов и систем (Иванова Л.А., 1995; Соколова Г.Б., 2000; Павлова М.В., 2000; Елькин А.В., 2000; Чуканов В.И. и др., 2000). В связи с этим очевидна необходимость многопланового, целенаправленного совершенствования комплексной терапии туберкулеза, включая и патогенетические средства, способствующие оптимизации функционирования систем защиты организма больного.

В настоящее время создан и введен в медицинскую практику ряд лекарственных средств метаболического действия, среди которых для фтизиатрии большой интерес представляет отечественный препарат глутоксим – производное тиопозтинов. Являясь структурным аналогом окисленного глутатиона, глутоксим обладает высокой биодоступностью, модулирующим воздействием на внутриклеточные процессы тиолового обмена, способствует инициации системы цитокинов, активации фагоцитоза (Кожемякин Л.А., Балазовский М.Б., 1996, 1997; Кожемякин Л.А. и др., 1999; Антушевич А.Е. и др., 2002).

Глутоксим показал высокую эффективность как средство профилактики и лечения вторичных иммунодефицитных состояний, ассоциированных с радиационными, химическими и инфекционными факторами, острых и хронических вирусных гепатитов В и С, а также послеоперационных осложнений (Тиглиев Г.С. и др., 1999; Жданов К.В., 2000; Орлов С.В., 2000; Лисянская А.С. и др., 2002; Суворова К.Н. и др., 2002).

Настоящее исследование посвящено изучению основных сторон фармакологической активности глутоксима как средства оптимизации комплексной терапии туберкулеза.

На основании экспериментально-клинических исследований, проведенных в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии, НИИ фтизиопульмонологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, Центральном НИИ туберкулеза РАМН решением Фармакологического комитета Минздрава России от 28.11.02 препарат глутоксим разрешен к применению при туберкулезе легких.

Цель работы. На основе экспериментальных исследований определить возможность использования производного тиопозтинов глутоксима в качестве средства сопровождения химиотерапии туберкулеза.

Задачи исследования

1. В условиях *in vitro* изучить действие глутоксима на рост МБТ и специфическую активность противотуберкулезных препаратов.

2. Изучить влияние глутоксима на эффективность этиотропного лечения мышей, зараженных чувствительной культурой *M. bovis-bovinus* 8.

3. Исследовать влияние глутоксима на эффективность этиотропной терапии мышей, зараженных клиническим полирезистентным изолятом МБТ.

4. Изучить гепатозащитную активность глутоксима при поражении печени противотуберкулезными препаратами.

5. Изучить действие глутоксима на процессы репаративной регенерации в легких и печени.

Научная новизна. В результате проведенного исследования впервые в эксперименте обоснована возможность применения нового препарата глутоксима в качестве средства сопровождения этиотропной терапии туберкулеза, вызванного микобактериями с различными биологическими свойствами. Установлены механизмы реализации лечебного действия глутоксима при экспериментальном туберкулезе. Дана комплексная характеристика свойств глутоксима, обеспечивающих коррекцию гепатотоксических проявлений химиотерапии туберкулеза. Раскрыты ранее неизвестные свойства глутоксима - стимулировать регенеративные процессы в тканях легких и печени.

Практическая значимость работы. Выявленные в экспериментальных исследованиях особенности фармакодинамики глутоксима позволят более обоснованно наметить показания к его использованию для лечения больных туберкулезом, что повысит эффективность терапии, снизит риск токсигенности этиотропных средств.

Разработана и внедрена в лабораторную практику Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии оригинальная методика оценки эффективности новых лекарственных средств, схем, а также вирулентности МБТ, выделенных от больных туберкулезом легких, на основе морфометрического измерения объема пораженной легочной ткани.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Включение глутоксима в комплексное лечение экспериментального туберкулеза, вызванного микобактериями с различной биологической характеристикой, существенно повышает эффективность этиотропной терапии. Под влиянием глутоксима регистрируются повышение спонтанной и индуцированной продукции супероксидных радикалов макрофагами, стимуляция их поглотительной и переваривающей способности, обеспечивающих завершенность фагоцитоза микобактерий.

2. Значимый вклад в повышение результатов лечения туберкулеза вносит способность глутоксима корригировать структурно-метаболические нарушения печени, возникающие под влиянием противотуберкулезных препаратов, за счет нормализации активности аминотрансфераз и перекисного окисления липидов, снижения концентрации билирубина, активации микросомального окисления, улучшения гемодинамики, восстановления гистоархитектоники органа.

3. Глутоксим, оказывая стимулирующее влияние на процессы репарации, способствует восстановлению в более сжатые сроки массы и архитектоники регенерирующей ткани легких и печени, улучшению условий регенерации.

Реализация результатов работы. На предложенный способ лечения туберкулеза легких с использованием глутоксима получен патент № 2197984 RU Способ лечения различных форм туберкулеза, в том числе резистентных к противотуберкулезной химиотерапии / Л.А. Кожемякин, М.И. Перельман, Г.Б. Соколова, Л.А. Иванова, С.Н. Васильева, Н.В. Сапожникова, Ю.В. Корнеев.

Результаты исследования внедрены в практику научно-исследовательской и лечебной работы Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, а также в учебный процесс на кафедре фтизиатрии Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования и кафедре терапии с кур-

сом клинической фармакологии Санкт-Петербургской Государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.

Апробация материалов диссертации. Основные положения работы доложены и обсуждены на Региональной научно-практической конференции (Санкт-Петербург, 1999); II Международной Ассамблее «Новые медицинские технологии» (Москва, 2000); на 11,12 и 13 Национальных конгрессах по болезням органов дыхания (Москва 2001, 2002; Санкт-Петербург, 2003); на VII Российском съезде фтизиатров (Москва, 2003).

По результатам исследования опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на ... страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, трех глав с изложением использованных методов и результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, указателя литературы, включающего ... источника, в том числе ... отечественных и ... иностранных. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 11 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе изучен отечественный препарат глутоксим – производное тиопозитинов. Всего выполнено 12 серий опытов *in vitro*, экспериментальная работа проведена на 562 белых беспородных мышах и 231 белой крысе.

Влияние глутоксима на рост микобактерий определялось стандартным методом двукратных серийных разведений в жидкой синтетической среде Сонта с 10% нормальной лошадиной сыворотки. Диапазон исследуемых концентраций глутоксима составлял от 100 до 0,195 мкг/мл. В качестве тест-штаммов *in vitro* использованы лабораторные культуры МБТ, чувствительные к противотуберкулезным препаратам: *M. tuberculosis* H37RV и «Academia», *M. bovis-bovinus* 8.

Для изучения влияния глутоксима на специфическую активность противотуберкулезных препаратов использовался метод дозированного посева сус-

пензии штамма *M. tuberculosis* H37RV на плотные питательные среды после предварительной экспозиции в жидкой среде Сотона с 10% сыворотки, содержащей исследуемое вещество и противотуберкулезные препараты.

В опытах по экспериментальной терапии использовалась модель генерализованного туберкулеза, воспроизводимая введением в боковую хвостовую вену мышей вирулентных культур микобактерий: *M. bovis-bovinus* 8, чувствительной к противотуберкулезным препаратам, и клинического штамма №5419 СПБНИИФ, выделенного от больного с впервые выявленным туберкулезом легких, устойчивого к изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (50 мкг/мл). Инфицирующая доза составляла 0,1 мг культуры МБТ в 0,2 мл физиологического раствора.

Глутоксим применяли в средних терапевтических дозах в пересчете на поверхность тела животных: при монотерапии в дозах 10 мг/кг и 20 мг/кг, подкожно или на фоне этиотропных средств в дозах 10 мг/кг, 20 мг/кг и 40 мг/кг, подкожно.

Для лечения мышей, зараженных *M. bovis-bovinus* 8, использовался комплекс противотуберкулезных препаратов: 1) изониазид (10 мг/кг, подкожно) + рифампицин (10 мг/кг, внутрь); 2) изониазид (10 мг/кг, подкожно) + рифампицин (10 мг/кг, внутрь) + пиазинамид (20 мг/кг, внутрь). Лечение мышей, зараженных устойчивым штаммом, осуществлялось по двум схемам: 1) рифабутин (7,5 мг/кг, внутрь) + циклосерин (8 мг/кг, внутрь) + протионамид (20 мг/кг, внутрь) + этамбутол (20 мг/кг, внутрь); 2) изониазид (25 мг/кг, подкожно) + амикацин (30 мг/кг, подкожно) + офлоксацин (20 мг/кг, внутрь) + этамбутол (50 мг/кг, внутрь). Средняя продолжительность курса комплексного лечения составляла 8 недель. В каждой серии опытов присутствовали группы интактных (незараженных, нелеченных) и зараженных нелеченных животных (контроль заражения). Животных выводили из опыта в два этапа – через 4 и 8 недель комплексной терапии путем декапитации согласно Методическим рекомендациям МЗ СССР (1985).

Эффективность лечения экспериментального туберкулеза оценивалась по

динамике массы тела животных, коэффициентам массы легких, индексам их поражения (Александрова А.Е., Ариэль Б.М., 1993), высеваемости МБТ из гомогенатов селезенок. Гистологическое исследование проводили на срезах ткани легких, окрашенных гематоксилином и эозином. Объем пораженной легочной ткани регистрировали по методу точечного счета (Henning A., 1956) в оригинальной модификации (Васильева С.Н. и др., 2003).

Оценку функционального состояния перитонеальных макрофагов (пМф) осуществляли в динамике комплексной терапии (в середине и в конце курса лечения) по супероксидпродуцирующей активности и в реакции фагоцитоза. Продукцию пМф супероксиданиона исследовали по восстановлению нитросинего тетразолия («Serva») в не стимулированных пробах и при добавлении опсонизированного зимозана (3 мг/мл «Sigma») на 96-луночных планшетах (Pick E. et al., 1981). В реакции фагоцитоза взвеси дрожжевых клеток вида *Saccharomyces cerevisiae* (1×10^7 на чашку), предварительно опсонизированных сывороткой мышей, определяли поглотительную и переваривающую активности пМф.

Повреждение печени моделировали на крысах по методике Ю.И. Сливки (1989) путем введения противотуберкулезных препаратов в дозах: изониазид (И) 50 мг/кг, подкожно; рифампицин (R) 250 мг/кг, внутрь; пипразинамид (Z) 45 мг/кг, внутрь. Глутоксим применяли подкожно в дозах 20 мг/кг и 40 мг/кг за 2 часа до введения противотуберкулезных средств. Все препараты вводились ежедневно на протяжении 14 дней. В качестве контроля использовали интактных крыс, а также животных, получавших только комплекс противотуберкулезных препаратов. Степень поражения печени оценивали по активности аланин - и аспартатаминотрансфераз в сыворотке крови с использованием набора реактивов «Витал Диагностик СПб» и по содержанию билирубина в сыворотке крови по Jendrassik L., Cleghorn K. (1936). О нарушении перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по уровню малонового диальдегида (МДА) в гомогенатах печени (Kohn H.J., Siversedge M., 1944). В микропрепаратах печени крыс, окрашенных гематоксилином и эозином, учитывали

выраженность дистрофических изменений и состояние микроциркуляторного русла стереологическим методом с помощью сетки Вейбеля.

С целью изучения влияния глутоксима на активность микросомальных ферментов печени выполняли на мышах гексеналовый тест. В качестве модельного вещества (метаболического маркера) использовали гексенал. Глутоксим применяли в дозе 40 мг/кг, подкожно. Препаратом сравнения был известный гепатопротектор эссенциале.

Процессы репаративной регенерации легких и печени изучали в двух сериях опытов на 120 здоровых крысах. Под поверхностным эфирным наркозом производили левостороннюю пневмонэктомию по методике Л.К. Романовой (1963) или удаляли 2/3 (левая и медиальная доли) печени (Higgins G. M., Anderson R.M., 1931). Глутоксим вводили подкожно в дозе 40 мг/кг. В каждой серии опытов выделяли группу крыс, не получавших лечение (контроль). На 4, 10, 14 и 25 сутки после операции животных выводили из опыта путем декапитации. О состоянии процессов репаративной регенерации судили: по скорости развития и качеству течения компенсаторной гипертрофии правого легкого, нарастанию массы легких и печени, микроскопическому исследованию срезов ткани органов, окрашенных гематоксилином-эозином.

При оценке полученных результатов использовали параметрический тест Стьюдента-Фишера (Урбах В.Ю., 1967) и непараметрический метод Уилкоксона-Манна-Уитни (Гублер Е.В., 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах *in vitro* установлено, что глутоксим не обладал ингибирующим действием на размножение микобактерий, не влиял на специфическую активность известных противотуберкулезных препаратов (изониазида, рифампицина, этамбутола, стрептомицина). В условиях монотерапии глутоксим не оказывал лечебного действия при экспериментальном туберкулезе.

Использование глутоксима на фоне этиотропных средств способствовало уменьшению тяжести инфекции, вызванной МБТ с различными биологическими свойствами.

Наиболее значимый прирост эффективности терапии мышей, зараженных чувствительной культурой *M. bovis-bovinus* 8, был получен при использовании глутоксима в дозе 20 мг/кг. Включение глутоксима в этой дозе в комплексное лечение (H+R+Z) генерализованного туберкулеза уже через один месяц привело к уменьшению по сравнению с группой контроля лечения индекса поражения легких и коэффициентов массы легких, печени и селезенки до $2,1 \pm 0,11$ усл. ед. против $2,42 \pm 0,06$ усл. ед., ($p < 0,05$); $1,46 \pm 0,09$ усл. ед. против $1,77 \pm 0,11$ усл. ед., ($p < 0,05$); $4,82 \pm 0,27$ усл. ед. против $5,64 \pm 0,23$ усл. ед., ($p < 0,05$) и $1,01 \pm 0,03$ усл. ед. против $1,23 \pm 0,09$ усл. ед., ($p < 0,05$). Получено и значимое снижение роста микобактерий в посевах гомогенатов селезенки со $160 \pm 20,4$ КОЕ до $110 \pm 10,7$ КОЕ ($p < 0,05$). По данным гистологического исследования легочной ткани мышей, под действием глутоксима отмечено существенное снижение распространенности специфического воспаления и увеличение площади воздушной легочной ткани (рис.1).

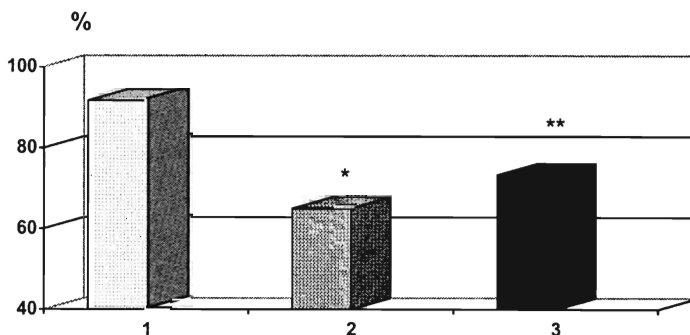


Рис. 1. Влияние глутоксима в дозе 20 мг/кг (8 недель терапии) на площадь воздушности легочной ткани мышей, зараженных *M. bovis-bovinus* 8. 1 – интактные, 2 – HRZ, 3 – HRZ + глутоксим. * - достоверно по сравнению с интактной группой, ** - достоверно по сравнению с контролем лечения.

Удлинение курса применения глутоксима обеспечивало дальнейший прирост эффективности этиотропного лечения.

У мышей, зараженных лекарственно устойчивым штаммом, оптимальной оказалась доза глутоксима 40 мг/кг. Использование препарата в этой дозе на

фоне комплекса противотуберкулезных препаратов в высших терапевтических дозах (изониазид 25 мг/кг, амикацин 30 мг/кг, офлоксацин 20мг/кг, этамбутол 50 мг/кг) позволило повысить эффективность лечения туберкулезной инфекции. Уже в середине курса лечения регистрировалось значимое уменьшение распространенности специфического воспаления в легких по индексу их поражения (с $4,5 \pm 0,14$ усл. ед. в контроле заражения и $3,0 \pm 0,11$ усл. ед. в контроле лечения до $2,55 \pm 0,11$ усл. ед., $p < 0,001$ и $0,02$, соответственно); снижение коэффициента массы легких (с $3,30 \pm 0,11$ усл. ед. в контроле заражения и $2,7 \pm 0,13$ усл. ед. в контроле лечения до $2,15 \pm 0,17$ усл. ед., $p < 0,002$ и $0,05$, соответственно). Об ослаблении тяжести течения инфекции под влиянием глутоксима свидетельствовали и данные бактериологического исследования. Количество выросших микобактерий в посевах гомогенатов селезенки мышей, получавших глутоксим, было ниже в 1,9 раза ($p < 0,001$) и в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующими показателями у животных контроля заражения и контроля лечения.

Результаты морфометрических исследований на этом сроке наблюдения показали благоприятное влияние глутоксима на регрессию специфических изменений в легочной ткани мышей. В дальнейшем положительная динамика стала еще более отчетлива (рис.2). Отмечалось существенное повышение воздушности легочной ткани ($74,4 \pm 0,5$ против $65,9 \pm 0,9\%$ в группе контроля лечения, $p < 0,001$), уменьшение в 1,8 раза лимфоцитарных инфильтратов ($4,4 \pm 0,4$ против $8,0 \pm 0,5\%$, $p < 0,001$), сокращение площади деформированных альвеол ($7,9 \pm 0,5\%$ против $9,7 \pm 5,4\%$, $p < 0,001$).

Таким образом, результаты экспериментов, проведенных на моделях лекарственно чувствительного и полирезистентного туберкулеза у мышей, показали, что глутоксим в комплексе с противотуберкулезными препаратами из различных групп способствовал значимому улучшению результатов лечения, что подтверждалось существенным снижением параметров тяжести течения инфекции.

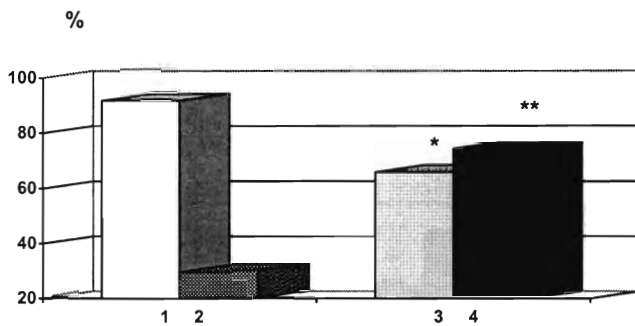


Рис. 2. Влияние глутоксима в дозе 40 мг/кг на воздушность легочной ткани мышей, зараженных лекарственно устойчивым штаммом МБТ. 1 – интактные, 2- контроль заражения, 3 – контроль лечения (ПТП: HEAFt), 4 – ПТП + глутоксим. * - достоверно по сравнению с интактными животными, ** - достоверно по сравнению с контролем лечения.

Поскольку для туберкулеза характерными являются нарушения репаративных процессов (Ерохин В.В. и др., 1987, 2000; Старостенко Е.В., 1993; Осташко О.М., Ариэль Б.М., 1994 и др.) изучено влияние глутоксима на скорость и качество восстановительных реакций в легких после левосторонней пневмонэктомии.

Под влиянием глутоксима общая картина регенерации легочной ткани сохраняет особенности, отмеченные у контрольных животных, но имелись отчетливые различия в качестве течения компенсаторного процесса. Уже в ранние сроки после операции (4 сутки) явления эмфиземы, отека и гемодинамические расстройства были выражены в меньшей степени. Регенераторный процесс приобретал своеобразие. В отличие от контрольных животных, происходит активация лимфоидных скоплений в корне легкого и заселение лимфоидными элементами периваскулярных и перибронхиальных пространств. Массивные лимфоидные скопления в корне легкого, межальвеолярных перегородках, перибронхиальной и периваскулярной ткани определялись с большим постоянством уже с 10 суток после оперативного вмешательства, и к 25 суткам имелись у всех опытных крыс, получавших глуток-

сим. Регистрировалось более полное и быстрое нарастание массы единственного правого легкого (рис.3).



Рис.3. Влияние глутоксима на скорость восстановления сухого веса правого легкого у крыс. * - достоверно при сравнении с прооперированными нелечеными животными

Начиная с 10 суток наблюдения и в последующие сроки после пневмонэктомии, сухая относительная масса правого легкого опытных животных достоверно превышала соответствующие показатели контрольной группы ($125,2 \pm 4,9$ мг против $103,7 \pm 4,2$ мг, $p < 0,05$) и приближалась к ее величине у intactных животных ($125,2 \pm 4,9$ мг и $138,8 \pm 3,9$ мг). У контрольных нелеченных крыс даже на 25 сутки после операции сухая относительная масса правого легкого ($107,8 \pm 4,4$ мг) не достигает intactного уровня ($138,8 \pm 3,9$ мг).

Эти улучшения, способствуя сохранению эластичности ткани легких, определяют снижение тяжести острой дыхательной недостаточности, предотвращают развитие гипоксической гипоксии, возникающей после обширной резекции (Билич Г.Л., 1987).

Заметная стимуляция репаративных процессов в легких под влиянием глутоксима обнаружена при генерализованном туберкулезе у мышей, что

проявилось в восстановлении структуры (многорядности) бронхиального эпителия, значительно нарушенной у зараженных нелеченных и получавших этиотропную терапию животных.

В литературе имеются сведения о понижении функциональной активности макрофагов при туберкулезной инфекции и под воздействием противотуберкулезных средств (Виноградова Т.И., 1994; Антоненкова Е.В., 1996; Ерохин В.В., 2001; Чернушенко Е.Ф. и др., 2002; Заболотных Н.В., 2003).

Использование глутоксима в комплексной терапии мышей, зараженных как чувствительным, так и устойчивым штаммами МБТ сопровождалось повышением поглотительной и переваривающей функции пМф. Через один месяц терапии экспериментального туберкулеза, вызванного чувствительным возбудителем, при использовании глутоксима регистрировали увеличение всех показателей фагоцитарной функции пМф: фагоцитарной активности – до $66,0 \pm 3,6\%$ против $37,0 \pm 2,5\%$ в контроле лечения ($p < 0,001$); фагоцитарного числа до $7,8 \pm 0,2$ усл. ед. против $4,7 \pm 0,2$ усл. ед. ($p < 0,001$); показателя завершенности фагоцитоза – до $399,3 \pm 3,8$ усл. ед. против $189,8 \pm 8,2$ усл. ед. ($p < 0,001$); индекса завершенности фагоцитоза – до $4,5 \pm 0,3$ усл. ед. против $1,9 \pm 0,1$ усл. ед. ($p < 0,001$). Значения всех перечисленных показателей были достоверно выше, чем у интактного контроля (рис. 4). Активация глутоксимом поглотительной и переваривающей функции пМф наблюдалась и через два месяца терапии экспериментального туберкулеза: фагоцитарная активность повысилась до $44,6 \pm 1,9\%$ против $32,0 \pm 3,4\%$ в группе контроля лечения ($p < 0,02$), показатель завершенности фагоцитоза – до $214,4 \pm 7,5$ усл. ед. против $162,0 \pm 6,4$ усл. ед. ($p < 0,001$).

Применение глутоксима (20 мг/кг) в комплексе с этиотропными средствами (HRZ) способствовало поддержанию генерации супероксидных радикалов пМф на протяжении всего курса лечения (2 месяца) на уровне, значимо превышавшем контроль лечения. Так, на первом сроке наблюдения восстановление НСТ по сравнению с контролем лечения повысилось в нестимулиро-

ванной культуре пМФ до $0,121 \pm 0,002$ усл. ед. ($p < 0,01$), в индуцированной – до $0,442 \pm 0,028$ усл. ед. ($p < 0,01$).

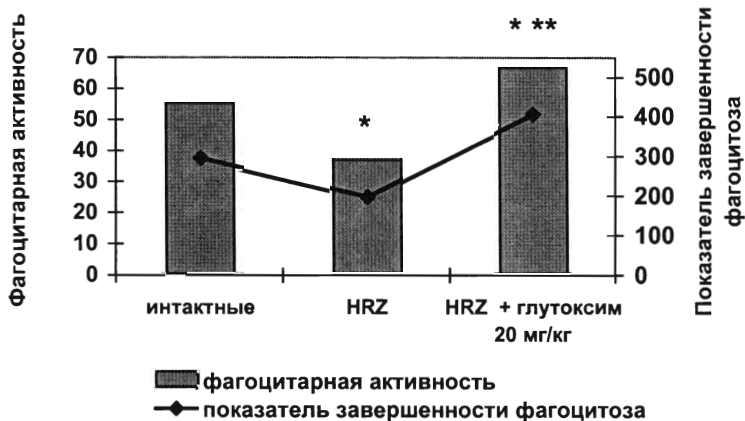


Рис.4. Влияние глутоксима (4 недели терапии) на показатели фагоцитоза пМФ мышей при экспериментальном генерализованном туберкулезе. * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с группой животных, получавших HRZ.

На втором сроке обследования, когда у мышей контроля лечения отмечалось угнетение НСТ – активности, в группе с использованием глутоксима регистрировалось повышение уровня выработки супероксидных радикалов как в нестимулированной ($0,125 \pm 0,008$ усл. ед. против $0,04 \pm 0,009$ усл. ед., $p < 0,001$), так и в индуцированной ($0,315 \pm 0,09$ усл. ед. против $0,115 \pm 0,009$ усл. ед., $p < 0,001$) реакциях.

Таким образом, активирующее действие глутоксима на функцию пМФ проявлялось при ее выраженном угнетении туберкулезным процессом и длительной этиотропной терапией.

Полихимиотерапия способствовала лишь частичному восстановлению фагоцитарной функции макрофагов у мышей, зараженных клиническим лекарственно устойчивым штаммом МБТ (рис. 5). Глутоксим в дозе 20 мг/кг существенно повысил поглотительную и переваривающую функцию пМФ. Значения всех показателей достоверно превышали аналогичные в группах контро-

ля заражения и контроля лечения: фагоцитарная активность повысилась в 2,1 и 1,3 раза (соответственно, $p < 0,001$); фагоцитарное число – в 1,5 и 1,2 раза, ($p < 0,001$, $p < 0,002$); показатель завершенности фагоцитоза – в 29,5 и 1,8 раза ($p < 0,001$).



Рис. 5. Влияние глутоксима (4 недели терапии) на показатели фагоцитоза у мышей, зараженных лекарственно устойчивым штаммом МБТ. * - достоверно при сравнении с интактной группой, ** - при сравнении с контролем лечения (ПТП: HEAFt).

При использовании глутоксима в дозе 40 мг/кг регистрировали стимулирующее действие препарата на фагоцитарную функцию пМФ: фагоцитарная активность увеличилась в 1,3 и 1,7 раза ($p < 0,05$ и $p < 0,001$); фагоцитарное число – в 1,5 и 1,8 раза ($p < 0,001$); показатель завершенности фагоцитоза – в 1,3 и 2,4 раза ($p < 0,005$ и $p < 0,001$); индекс завершенности фагоцитоза – в 2,0 и 2,5 раза ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно).

Таким образом, глутоксим на фоне этиотропной терапии экспериментального туберкулеза оказывал благоприятное влияние на фагоцитарную функцию макрофагов. Это выражалось в нормализации этой функции при его использовании в дозе 20 мг/кг и стимуляции – при применении в дозе 40 мг/кг.

Токсическое повреждение печени является нередким осложнением лекарственной терапии во фтизиопульмонологии (от 13,5% до 65,5%). При воздей-

ствии гепатотоксинов развивается сложный симптомокомплекс, в основе которого лежат нарушения механизмов регенерации, глутатионовой окислительно-восстановительной системы, усиление перекисного окисления липидов и других (Голиков С.Н. и др., 1986; Гурылева М.Э., 1994; Полунина Т.Е., 1999; Тельных Ю.В., 1999; Кинзирская Ю.А. и др., 2003).

Анализ биохимических показателей, отражающих функциональное состояние печени крыс, получавших только противотуберкулезные препараты (Н+R+Z), свидетельствовал о наличии признаков печеночной патологии, описанной многими авторами (Литвинов А.В., 1984; Николаев В.П., 1987; Сливка Ю.И., 1989; Скакун Н.П. и др., 1991; Виноградова Т.И., 1994 и др.). Токсическое действие противотуберкулезных средств на печень проявилось: достоверным превышением в 7,9 раза в сыворотке крови крыс билирубина по сравнению с установленной нами нормой; возрастанием активности маркерных ферментов АЛАТ – с $0,85 \pm 0,16$ ммоль/ч•л (интактный контроль) до $1,22 \pm 0,12$ ммоль/ч•л ($p < 0,05$); АсАТ – с $1,3 \pm 0,12$ ммоль/ч•л до $1,67 \pm 0,07$ ммоль/ч•л ($p < 0,05$). При использовании глутоксима наблюдалось выраженное снижение гепатотоксических проявлений противотуберкулезных препаратов. При этом уровень гепатозащитной активности зависел от дозы глутоксима. Наиболее значимый гепатопротекторный эффект глутоксим оказывал в дозе 40 мг/кг. В этой группе животных под влиянием глутоксима активность АЛАТ снизилась до $0,93 \pm 0,10$ ммоль/ч•л; АсАТ – до $1,48 \pm 0,07$ ммоль/ч•л против $1,22 \pm 0,12$ ммоль/ч•л и $1,64 \pm 0,07$ ммоль/ч•л соответственно у контрольных животных, получавших только комплекс Н+R+Z ($p < 0,05$). Глутоксим на фоне противотуберкулезных средств вызывал достоверное уменьшение концентрации билирубина в сыворотке крови крыс до $11,9 \pm 0,29$ мкмоль/л против $17,0 \pm 2,26$ мкмоль/л ($p < 0,01$) у контрольных животных (Н+R+Z). Глутоксим (40мг/кг) полностью нормализовал нарушенное противотуберкулезными препаратами перекисное окисление липидов. При этом содержание МДА в гомогенатах печени животных этой группы снизилось до $6,94 \pm 0,44$ нмоль/г,

что соответствовало установленной нами норм у интактных крыс ($6,59 \pm 0,38$ нмоль/г).

При морфологическом исследовании срезов печени крыс, получавших глутоксим в комплексе с противотуберкулезными средствами, отмечена тенденция к нормализации структуры печени, также более отчетливая при использовании глутоксима в дозе 40 мг/кг. При этом печеночные балки имели правильное радиальное направление, и хотя гепатоциты были несколько увеличены в размерах, форма их сохранялась. Под влиянием глутоксима наблюдалось улучшение гемодинамики печени. Коэффициенты эффективной васкуляризации как в центральной, так и в периферической частях долек статистически не отличались от соответствующих показателей в интактной группе и в 3,8-4,5 раза превышали цифровые данные животных, получавших только противотуберкулезные средства.

Нормализующее действие глутоксима на детоксицирующую функцию печени подтверждено и на модели гексеналового сна. Так, под влиянием глутоксима продолжительность снотворного эффекта гексенала сократилась на 49,3 % ($p < 0,002$) по сравнению с интактным контролем и была сопоставима с аналогичной активностью стандартного гепатопротектора эссенциале (30,55 минут и 32,16 минут, соответственно).

Таким образом, глутоксим на уровне эссенциале оказывал стимулирующее влияние на активность микросомальных ферментов печени.

Глутоксим проявил стимулирующее влияние и на процессы регенерации в печени. У животных, которым после частичной гепатэктомии вводили глутоксим, по сравнению с нелечеными, отмечено более интенсивное и раннее восстановление массы регенерирующей печени (рис.6). К 25 дню после операции масса органа под воздействием глутоксима достигла $6,6 \pm 0,17$ и $6,6 \pm 0,14$ г соответственно, что было на уровне значений печени интактных крыс ($6,5 \pm 0,04$ г против $5,72 \pm 0,14$ г в контроле).

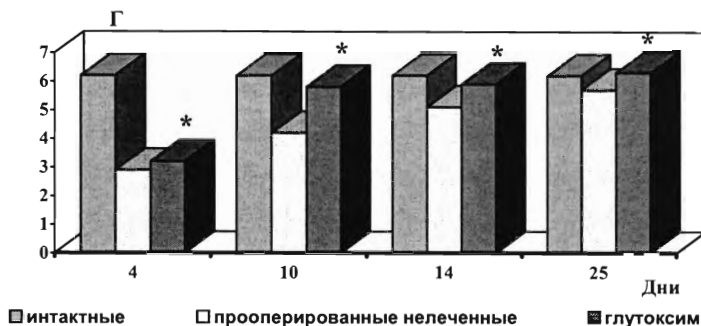


Рис.6. Влияние глутоксима на скорость восстановления массы печени крыс. * - достоверно при сравнении с нелечеными животными

При гистологическом исследовании было установлено, что применение глутоксима способствовало сокращению деструктивно-реактивной фазы регенерации, более быстрому восстановлению клеточных структур гепатоцитов. Под влиянием глутоксима общая архитектоника восстанавливается в 5-6 раз быстрее. Так, уже на 4 сутки после операции балочная композиция определяется у 80 % животных, на 10 сутки – у всех крыс опытной группы. Восстановление печеночной ткани у контрольных (оперированных нелеченных) животных обеспечивается за счет клеточных и внутриклеточных регенераторных реакций, степень выраженности которых изменялась в течение всего периода исследования. К 14 дню после резекции печени наблюдалась лишь тенденция к стабилизации регенераторного процесса. В условиях применения глутоксима отмечены отчетливые различия в качестве течения компенсаторного процесса с преобладанием внутриклеточной регенераторной реакции, причем этот процесс протекал на фоне отсутствия заметного усиления митотической активности гепатоцитов. Уже на 4 сутки после операции относительное количество двуядерных гепатоцитов превышало в 1,9 раза ($15,8 \pm 0,3\%$ против $8,2 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$), полиплоидных – в 2,4 раза ($7,7 \pm 0,2\%$ против $3,3 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$), клеток с содержанием более двух ядрышек в 1,7 раза ($49,5 \pm 0,5\%$ против $28,4 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$), в сравнении с соответствующими

данными, полученными у оперированных нелеченных животных. В последующие сроки наблюдения содержание полиплоидных клеток, а также гепатоцитов с увеличенным числом ядрышек достоверно превышало соответствующие количественные показатели печени контрольных животных (рис. 7). Следует особо подчеркнуть, что глутоксим тормозил развитие патологических дистрофических изменений в ядрах, что наиболее ярко демонстрируется на раннем сроке (4 сутки) наблюдения ($6,1 \pm 0,2\%$ против $19,3 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$ в контрольной группе).



Рис.7. Влияние глутоксима на цитологические показатели регенерации печени (4 сутки после частичной гепатэктомии). 1 – одноядерные гепатоциты; 2 – двухядерные гепатоциты; 3 – полиплоидные клетки; 4 – клетки, имеющие более 2 ядра; 5 – дистрофические изменения. * - достоверно при сравнении с контролем (прооперированные нелеченные).

Таким образом, глутоксим обладает способностью существенно снижать выраженность структурно-метаболических нарушений печени при ее повреждении противотуберкулезными средствами, кроме того, сокращать период деструктивно-реактивных изменений гепатоцитов, стимулировать функциональную активность клеток печени и явные гипертрофические процессы (увеличение количества двухядерных и полиплоидных клеток).

Результаты проведенного исследования показали, что использование глутоксима в комплексе с противотуберкулезными средствами создает возмож-

ность корректировать ряд нарушенных туберкулезным процессом и полихимиотерапией функций организма и, тем самым, повысить эффективность лечения.

ВЫВОДЫ

1. Введение глутоксима в комплексную терапию мышей, инфицированных чувствительными и полирезистентными штаммами МБТ, повышает ее эффективность. Отмечается снижение тяжести инфекции, обсемененности МБТ селезенки, распространенности специфического поражения, а также увеличение площади функционирующей воздушной легочной ткани.

2. При экспериментальном туберкулезе в механизме лечебного действия глутоксима существенное значение имеет положительное влияние на функциональную активность перитонеальных макрофагов. Обнаруживается стимуляция их поглотительной и переваривающей способности, а также продукции супероксидных радикалов.

3. Глутоксим в условиях *in vitro* не обладает ингибирующим действием на рост МБТ и не оказывает влияния на специфическую активность основных противотуберкулезных препаратов. В условиях *in vivo* глутоксим в виде монотерапии не проявляет лечебного действия при экспериментальном туберкулезе. Выявленные фармакологические свойства глутоксима (иммуномодулирующие, детоксицирующие, гепатопротекторные, регенераторные) дают основание рассматривать его как средство сопровождения этиотропной терапии туберкулеза.

4. На фоне противотуберкулезных препаратов глутоксим улучшает антитоксическую функцию печени, нормализует активность аминотрансфераз и перекисное окисление липидов, препятствует цитолизу гепатоцитов, способствует полному восстановлению нарушенной гистоархитектоники печени.

5. Глутоксим проявляет свойства стимулятора регенерации печени и компенсаторной гипертрофии легких, способствуя более быстрому накоплению массы регенерирующего органа и нормализации цитологической картины.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для повышения эффективности терапии туберкулеза легких целесообразно использовать метаболический иммуномодулятор глутоксим как средство сопровождения этиотропной терапии.

Глутоксим, обладающий интенсифицирующим действием на процессы репарации легочной ткани, может использоваться для ускорения заживления тканевых дефектов при деструктивных формах туберкулеза легких.

Оптимальные дозы назначения глутоксима определяются характеристикой биологических свойств микобактерий. При туберкулезе с сохраненной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам рекомендуется назначать глутоксим в средних терапевтических дозах, при полирезистентном туберкулезе и наличии побочных эффектов химиотерапии целесообразно увеличить дозу препарата в 2 раза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Виноградова Т. И., Заболотных Н. В., Антоненкова Е.В., Васильева С.Н., Михайлова Т.В., Малыгина Е.И. Перспективные направления совершенствования этиопатогенетической терапии туберкулеза // Туберкулез как проблема здравоохранения на рубеже XX века: Тез. докл. Регион. науч. - практ. конференции. – СПб., 1999. – С.98.

2. Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Малыгина Е.И., Витовская М.Л. Результаты экспериментальных исследований по созданию современных технологий фармакологической коррекции этиопатогенетической терапии туберкулеза // Новые медицинские технологии:II Международ. Ассамблея, VII Международ. Ассамблея « Аптека – 2000». – М., 2000. – С. 22-23.

3. Васильева С.Н., Виноградова Т.И., Вишневыский Б.И., Кожемякин Л.А., Корнеев Ю.В. О перспективах использования во фтизиатрии нового класса лекарственных средств – тиопозтинов // Большой целевой журнал о туберкулезе. – 2001. – №13-14. – С.27.

4. Васильева С.Н., Сапожникова Н.В., Виноградова Т.И., Иванова Л.А., Павлова М.В., Корнеев Ю.В. Экспериментально-клиническая эффективность применения глутоксима во фтизиатрии // 11 Нац. Конгресс по болезням органов дыхания: Сб. резюме. – М., 2001. – С.244.

5. Васильева С.Н., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Момот Д.С. Влияние глутоксима на гепатотоксические проявления противотуберкулезных препаратов // Туберкулез в Северо-западном регионе России: Современные проблемы. – СПб., 2002. – С.188-191.

6. Васильева С.Н., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Кожемякин Л.А. Некоторые аспекты механизма действия глутоксима как препарата сопровождения химиотерапии туберкулеза // 12 Нац. Конгресс по болезням органов дыхания: Сб. резюме. – М., 2002. – С.277.

7. Патент 2197984 РФ Способ лечения различных форм туберкулеза, в том числе резистентных к противотуберкулезной химиотерапии / Л.А. Кожемякин, М.И. Перельман, Г.Б. Соколова, Л.А. Иванова, С.Н. Васильева, Н.В. Сапожникова, Ю.В. Корнеев – Гос. регистрация 10.02.2003.

8. Васильева С.Н., Виноградова Т.И., Сухов Ю.З., Кацер А.Р., Ариэль Б.М. Патоморфология иммуногенеза и иммунодепрессии при экспериментальном туберкулезе // Туберкулез сегодня: Материалы VII Рос. съезда фтизиатров. – М., 2003. – С. 64.

9. Васильева С.Н., Виноградова Т.И., Кацер А.Р., Сухов Ю.З., Ариэль Б.М. Оценка вирулентности микобактерий туберкулеза по объему поражений легких в эксперименте на мышах // Там же. – С. 82.

10. Ариэль Б.М., Виноградова Т.И., Васильева С.Н., Сухов Ю.З., Заболотных Н.В. К вопросу об иммунопатогенезе первичной туберкулезной пневмонии // 13 Нац. Конгресс по болезням органов дыхания: Сб. резюме. – СПб., 2003. – С. 264.