

## ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПІЇ НА АКТИВНІСТЬ ФАГОЦИТОЗУ У МОРСЬКИХ СВИНОК З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ТУБЕРКУЛЬОЗОМ

*І.А.Довженок, Абу-Кешк Талат Хафіз\**

Національний фармацевтичний університет  
Науково-дослідний інститут легеневих захворювань\*

*Ключові слова: туберкульоз легенів; фагоцитоз; ізоніазид; рифампіцин; канаміцин; рифабутин*

*Експерименти проводили на безпородних морських свинках обох статей масою 280-305 г. Досліджено дві комбінації протитуберкульозних препаратів: ізоніазид + рифампіцин + канаміцин та ізоніазид + офлоксацин + рифабутин. Імунотропну активність вивчали за допомогою методики визначення показників фагоцитозу, а також на моделях спонтанної та індукованої зимозаном люмінозалежної хемілюмінесценції (ЛЗХЛ) та НСТ-тесту. Встановлено, що зараження тварин туберкульозом спричиняє пригнічення клітинного імунітету. При лікуванні найбільш прийнятною виявилася комбінація ізоніазиду з офлоксацином і рифабутином. Результати, отримані для цієї комбінації препаратів, наближалися до отриманих для контрольних груп тварин, що свідчить про те, що вказана композиція не має прямої імунотоксичної дії.*

Туберкульоз відноситься до найчастіших причин смертності хворих від інфекційних агентів і на сьогодні залишається однією з головних проблем медицини. За даними ВООЗ, щорічно реєструється близько 3 млн смертельних і 8 млн нових випадків захворювання. У той же час 2 млрд людей, тобто третя частина населення земної кулі, інфіковані мікобактеріями туберкульозу [2, 7, 15].

Основним методом лікування туберкульозу є антибактеріальна терапія. Проте препарати, які застосовуються для лікування цього захворювання, мають серйозні побічні ефекти. Комбінована терапія дозволяє частково запобігти цим явищам, а також попередити розвиток стійких до дії препаратів штамів мікобактерій туберкульозу [4, 8, 13].

Крім того, останніми роками спостерігається зниження ефективності антибактеріальної і симптоматичної терапії туберкульозу. Пов'я-

зують це з наявністю у хворих тих або інших дефектів імунної системи. Тому великого значення набуває оцінка імуномодулюючих ефектів цих препаратів при значенні їх хворим з різними імунодефіцитними станами. Проте у літературі практично немає даних про взаємовплив протитуберкульозних препаратів і показників імунітету [1, 3, 6, 9, 11, 12, 14, 17].

У зв'язку з вищевикладеним метою наших досліджень було вивчення впливу комбінацій антибактеріальних препаратів на імунітет тварин, заражених мікобактеріями туберкульозу.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили на безпородних морських свинках обох статей масою 280-305 г. У серії дослідів було 30 тварин. Перша група морських свинок була інтактним контролем, друга група — заражені і неліковані тварини з контрольною патологією. Третій і

четвертій групам на тлі зараження вводили комбінації протитуберкульозних засобів: відповідно, ізоніазид + рифампіцин + канаміцин та ізоніазид + офлоксацин + рифабутин. Під час експерименту тварини знаходились у стандартних умовах віварію.

До проведення експериментів усім тваринам була проведена проба Манту для виключення у них ендогенного зараження. З метою відтворення розвитку туберкульозу було проведено внутрішньовенне зараження 1 мг суспензії культури лабораторного штаму H37Rv.

Лікування починали наступного дня після зараження і проводили протягом 30 днів. Рифабутин вводили *per os* із розрахунку 10 мг/кг маси тварин, рифампіцин — у дозі 15 мг/кг, офлоксацин — 2 мг/кг, ізоніазид — 10 мг/кг і канаміцин — 5 мг/кг.

З метою оцінки стану імунної системи фагоцитарну активність лейкоцитів визначали за уніфікованою методикою за допомогою інкубації культури клітин з частинками латексу [10].

Для дослідження використовували кров морських свинок.

**І.А.Довженок** — канд. фармацевт. наук, асистент кафедри фармакотерапії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

**Абу-Кешк Талат Хафіз** — аспірант Науково-дослідного інституту легеневих захворювань (м. Баку)

**Вплив протитуберкульозних препаратів на стан фагоцитозу у морських свинок, n=32**

Група	Фагоцитарна активність нейтрофілів через ...			
	30 хвилин	60 хвилин	фагоцитарний індекс	фагоцитарне число
Інтактний контроль	40,1±2,2	8,0±0,1	62,1±3,1	9,0±0,05
Контрольна патологія	19,0±1,1*	4,0±0,09*	36,0±1,1*	5,0±0,02*
Ізоніазид + офлоксацин + рифабутин	36,0±1,5	7,0±0,08	57,0±2,2	8,0±0,03
Ізоніазид + канаміцин + рифампіцин	27,0±3,2*	5,0±0,04*	39,0±1,1*	6,0±0,01*

Примітка. \* — достовірність значень у порівнянні з інтактним контролем

Для підрахунку кількості клітин використовували гемоцитометр (камеру Горяєва).

Гемоглобін, ШОЕ і лейкоцитарну формулу вивчали за загальноприйнятою методикою клінічного аналізу крові.

Фагоцитарну активність лейкоцитів визначали наступним чином. У відальевську пробірку наливали 0,1 мл 2% лимоннокислого натрію, 0,2 мл досліджуваної крові і 0,1 мл суспензії тест-мікроба (штаму стафілокока №209, суспензію якого готували з добової агарової культури за стандартом і розводили до 400 мл мікробних тіл в 1 мл). Усі компоненти ретельно змішували і пробірку поміщали на 30 хвилин у термостат при 37°C. Після інкубації її центрифугували впродовж 3 хвилин при 1000 обертах за хвилину. Потім з верхнього шару осаду готували мазок, який фіксували сумішшю Нікіфорова (рівні частини спирту і ефіру) і забарвлювали за Романовським-Гімзе. Для врахування результатів під мікроскопом проглядали 100 лейкоцитів (нейтрофілів) і визначали кількість поглинених ними мікробів [10].

Проводили визначення двох показників: фагоцитарного числа (кількість мікробів, поглинених у середньому одним лейкоцитом) і фагоцитарного індексу (кількість лейкоцитів із 100, що проявили фагоцитарну активність) [10].

Для оцінки утворення активних форм кисню фагоцитами використовували метод спонтанної та індукованої зимозаном люмінолзалежної хемілюмінесценції (ЛЗХЛ). Нейтрофіли виділяли на 3% же-

латині за стандартною схемою. Необхідна їх концентрація — 2 мл нейтрофілів у 1 мл суспензії лейкоцитів. ЛЗХЛ реєстрували на приладі 1251 Luminometer (LKB). У пластикові пробірки вносили 300 мкл клітинної суспензії. Після визначення пікового значення спонтанної ЛЗХЛ вносили 10 мкл зимозану (20 мг/мл; "Sigma"), опсонізованого пуловою сироваткою від 20 донорів, і реєстрували показники стимуляції ЛЗХЛ (у мВ/хв) [5].

НСТ-тест проводили за наступною методикою. До восьми ямок пластикового планшету вносили по 0,5 мл суспензії лейкоцитів крові ( $1 \times 10^6$  клітин у 1 мл). До чотирьох ямок планшету для активзації бактерицидних систем додавали по 0,025 мл інактивованої прогріванням суспензії стафілокока ( $1 \times 10^9$  клітин у 1 мл). Після 24-годинної інтубації при температурі 37°C планшети центрифугували при 1000 обертах за хвилину впродовж 10 хвилин. Надосадову рідину зливали і до ямок вносили по 0,05 мл 0,2% розчину нітросинього тетразолію (НСТ), ресуспензували та інкубували при температурі 37°C впродовж 1 години. Розчин НСТ зливали, клітини відмивали двічі фосфатно-буферним розчином (1 моль/л, рН 7,2) центрифугуванням при 1500 обертах за хвилину впродовж 10 хвилин. До осаду додавали 0,05 мл диметилсульфоксиду, ретельно суспензували до повного розчинення диформагану і доводили об'єм фосфатно-буферним розчином до 1 мл. У кювети вносили по 1 мл отриманих розчинів і визначали їх оптичну гус-

тину на спектрофотометрі при довжині хвилі 492 нм. Як контроль використовували суміш 0,05 мл диметилсульфоксиду і 0,95 мл фосфатно-буферного розчину [16].

**Результати та їх обговорення**

Результати вивчення фагоцитозу наведені у таблиці.

Як видно з даних таблиці, фагоцитарний індекс і фагоцитарне число знижувалися у групі заражених і нелікованих тварин, а в групах тварин, яким призначали лікування, підвищувалися. Так, фагоцитарний індекс у групі контрольної патології знижувався на 52,5% і 41,9%, а фагоцитарне число — на 50% і 44,4%, відповідно, через 30 і 60 хв.

Комбінація ізоніазиду з офлоксацином і рифабутином сприяла поверненню показників до рівня інтактного контролю: фагоцитарний індекс складав 90% і 91,9% відносно контролю, відповідно, через 30 і 60 хвилин, а фагоцитарне число — відповідно, 87,5% і 88,9%.

У групі тварин, яким призначали комбінацію ізоніазиду з канаміцином і рифампіцином, показники фагоцитозу були близькими до рівня хворих тварин. Фагоцитарний індекс, відповідно, складав 67,5% і 62,9% у порівнянні з інтактним контролем через 30 і 60 хвилин, а фагоцитарне число — відповідно, 62,5% і 66,7%.

Таким чином, показники фагоцитарної активності нейтрофілів більше за інші наближалися до здорових тварин інтактного контролю після застосування комбі-

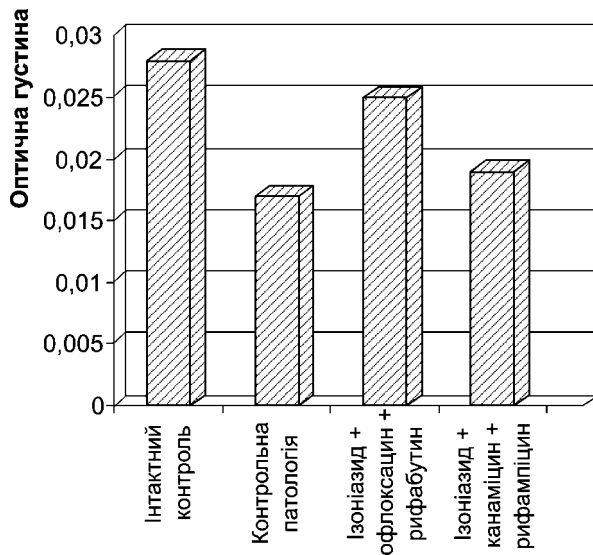


Рис. 1. Оптична густина розчинів у НСТ-тесті у хворих на туберкульоз морських свинок

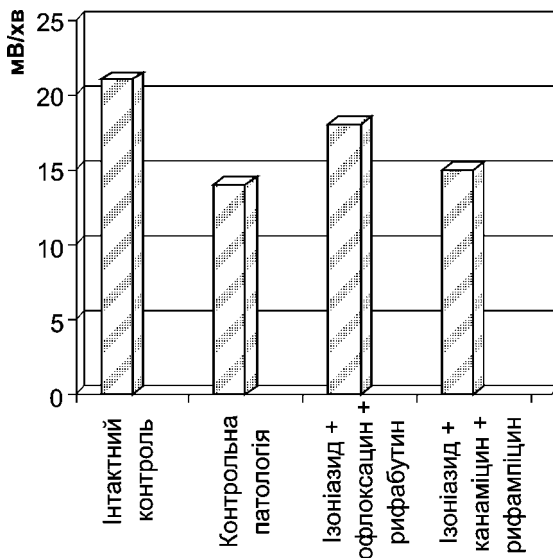


Рис. 2. Показники спонтанної ЛЗХЛ в експерименті

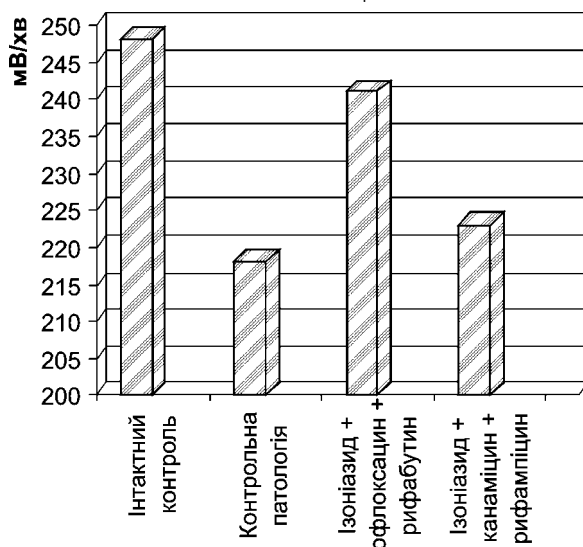


Рис. 3. Показники індукованої зимозаном ЛЗХЛ в експерименті

нації ізоніазиду з офлоксацином і рифабутином.

Результати, отримані в дослідженнях під час НСТ-тесту, наведені на рис. 1. Як показують експерименти, параметр, що вивчався, знижувався після зараження на 39,3%.

Комбінація ізоніазиду з офлоксацином і рифабутином сприяла тому, що фагоцитуюча активність клітин прагнула повернутися до інтактних значень (різниця з інтактним контролем склала 9,7%).

Призначення другої комбінації, в яку, окрім ізоніазиду, входили канаміцин і рифампіцин, незначно змінювало досліджуваний показник у відношенні тварин зараженої групи. А у відношенні інтактного контролю він склав 67,9%.

Таким чином, близькі до групи здорових морських свинок показники фагоцитуючої активності клітин були отримані у тварин, які одержували комбінацію ізоніазиду з рифабутином і офлоксацином.

Оцінку утворення активних форм кисню фагоцитами проводили методом спонтанної та індукованої зимозаном ЛЗХЛ. Дані, отримані у цих дослідженнях, наведені на рис. 2 і 3.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що ЛЗХЛ після зараження знижувалася: спонтанна — на 33,3%, а індукована — на 12,1%. Після лікування показники збільшувалися.

Так, після лікування комбінацією ізоніазиду з офлоксацином і рифабутином спонтанна ЛЗХЛ виявилася на 14,3% нижчою за рівень інтактного контролю, а індукована практично не відрізнялася від показника у здорових тварин. Призначення ізоніазиду разом із канаміцином і рифампіцином незначно змінювало параметри ЛЗХЛ у порівнянні з такими у нелікованих морських свинок. У відношенні інтактного контролю вони склали 71,4% і 89,9%, відповідно, для спонтанної та індукованої ЛЗХЛ.

Таким чином, призначення ізоніазиду разом з офлоксацином і рифабутином сприяло збереженню імунітету у дослідних тварин.

## ВИСНОВКИ

1. Зараження тварин туберкульозом спричиняє пригнічення імунітету.

2. При лікуванні туберкульозу найбільш прийнятною є комбі-

нація ізоніазиду з офлоксацином і рифабутиним.

3. Результати, отримані для вищеназваної комбінації, наближаються до даних, отриманих для групи тварин інтактного контро-

лю. Це свідчить про відсутність у даної композиції прямої імунотоксичної дії на відміну від другої композиції, до якої, окрім ізоніазиду, входять канаміцин та рифампіцин.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аленова А.Х., Исмаилова А.Т., Дильмагамбетов В.С. //Проблемы туберкулеза. — 2002. — №7. — С. 8-10.
2. Вартамян Ф.Е., Шаховский К.П. //Проблемы туберкулеза. — 2002. — № 2. — С. 48-50.
3. Инсанов А.Б., Абдуллаев Ф.М., Умняшкин А.А. //Азмеджурн. — 1995. — №11. — С. 19-20.
4. Соколова Г. //Врач. — 2001. — №2. — С. 15-19.
5. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. //Иммунол. — 1999. — №1. — С. 14-17.
6. Agger E.M., Weldingh K., Olsen A.W. et al. //Scand. J. Immunol. — 2002. — Vol. 56, №5. — P. 443-447.
7. Aoyagi T. //Kekkaku. — 1998. — Vol. 73, №7. — P. 459-470.
8. Benator D., Bhattacharya M., Bozeman L. et al. //Lancet. — 2002. — Vol. 360, №9332. — P. 528-534.
9. Bock N.N., Sterling T.R., Hamilton C.D. et al. //Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2002. — Vol. 165, №11. — P. 1526-1530.
10. Cashon H.J. //Cell. Immunol. — 1981. — Vol. 60, №1. — P. 1-10.
11. Chan C.H., Or K.K., Cheung W., Woo J. //J. Med. — 1995. — Vol. 26. — №1-2. — P. 43-52.
12. Desjardin L.E., Kaufman T.M., Potts B. et al. //Microbiol. — 2002. — Vol. 148, Pt 10. — P. 3161-3171.
13. Dutt M., Khuller G.K. //J. Antimicrob. Chemother. — 2001. — Vol. 47, №6. — P. 829-835.
14. Escalante P., Graviss E.A., Griffith D.E. et al. //Chest. — 2001. — Vol. 119, №6. — P. 1730-1736.
15. Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A. et al. //J. Bacteriol. — 2002. — Vol. 184, №19. — P. 5479-5490.
16. International index of laboratory animals /Compiled by M.F.W.Festing. — 6-th ed. — Leicester, 1993. — P. 65.
17. Joardar S.N., Ram G.C., Goswami T. //Med. Sci. Monit. — 2002. — Vol. 8, №11. — P. BR471-480.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,  
вул. Пушкінська, 53. Тел. (57) 700-36-34.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 05.03.2008 р.