

УДК 619.616.615.724.8.559.59

Г.Х.Мамадуллаев, УзНИИВ,
Д.Н.Долимов, УзНУ им. М.Улугбека.

РАЗРАБОТКА СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Аннотация

В статье приводятся результаты лабораторных испытаний нового противотуберкулёзного препарата «Тубазид-МАСКГ». Препарат испытан прямым и косвенным бактериологическими методами, а также на организме морских свинок, зараженных микобактериями туберкулёза типа *M. Humanis* и *M. Bovis*. Результаты опытов обобщены по данным бактериологических и патологоанатомических исследований и были подтверждены достаточной антимикробной эффективностью препарата «Тубазид-МАСКГ» против микобактерий.

Ключевые слова: туберкулёз, «Тубазид-МАСКГ», штамм, микобактерия, бовис, хуманис, вирулент, бактерицид, аллергия, туберкулинизация, патанатомия, бактериология туберкулёза.

Summary

The results of article is a laboratory researches of a new antituberculous preparation «Tubazid-MASKG». The preparation is tested direct and indirect by bacteriological methods and on an organism of the guinea pigs of common porpoises infected mycobacterium a tuberculosis of type *M. Humanis* and *Bovis*.

Results of experiences are generalised according to bacteriological and pathanatomical researches and was is reached sufficient antimicrobial efficiency of a preparation «Tubazid-MASKG» against mycobacterium a tuberculosis.

Обзор литературы. Туберкулёз – инфекционное заболевание, протекающее с преимущественным внутриклеточным (в макрофагах) паразитированием микобактерий. Воспалительный процесс, связанный с туберкулёзом, является классическим примером иммунного воспаления. Лечение туберкулёза, как правило, бывает длительным, но не всегда эффективным. Это связано с пониженной эффективностью защитных механизмов организма и появлением устойчивых рас возбудителя туберкулёза. Усиление процессов репарации, закрытие полостей распада обусловлено состоянием системы иммунитета, неспецифической защиты организма. Выявление тяжёлых прогрессирующих, осложнённых и полирезистентных форм туберкулёза различной локализации, которые трудно поддаются лечению, исходы болезни в основном не благоприятные.

Большая роль в развитии туберкулёза и туберкулёзно-го воспаления принадлежит иммунологическим процессам. Поэтому туберкулёз считают классическим примером иммунного воспаления. Несмотря на самую современную химиотерапию, лечение туберкулёза, как правило, бывает длительным и не всегда эффективным. Одной из причин малоуспешного лечения, по общепринятому мнению, является недостаточная эффективность защитных механизмов организма. Характерной чертой туберкулёзной инфекции является недостаточность собственных бактерицидных систем макрофагов для элиминации микобактерий. Макрофаги должны быть активированы, так как только активированные моноциты-макрофаги способны сдерживать рост микобактерий туберкулёза. Следствием активации клеток моноцитарно-макрофагальной системы является повышение функциональной активности практически всех звеньев защиты организма от инфекции: - факторов естественной резистентности (нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, NK-клеток); - факторов приобретённого иммунитета (гуморального, клеточного).

Активация клеток моноцитарно-макрофагальной системы ведет к повышению миграции нейтрофилов в воспалительный очаг, усилению активности лизосомальных ферментов, повышению способности фагоцитов, поглощать и убивать микробы. Поэтому, применение иммунокоррелирующих, усиливающих репаративные процессы иммуномодуляторов способных активировать моноцитарно-макрофагальные системы, очень важно при лечении и профилактике туберкулёза.

Целью нашего исследования является создание нового лекарственного средства на основе местного растительного сырья, обладающего не только антибактериальной, противотуберкулёзной, но и иммуномодулирующей активностью.

Таблица 1
Антибактериальная активность препарата Тубазид-МАСКГ

№	Название штамма	Конц. препарата, %	Срок инкубации	Результат	№	Название штамма	Конц. препарата, %	Срок инкубации	Результат
Прямой метод					Непрямой метод				
1	МБТ Humanis № 2520, МБТ Bovis 149	1,0	1 час 3 5 часа 1 сут-ки	- - - -	1	МБТ Humanis № 2015, МБТ Bovis 149	1,0	0	- - - -
2	МБТ Humanis № 2520, МБТ Bovis 149	2,0	30 мин. 1 час 3 час 1 сут-ки	- - - -	2	МБТ Humanis № 2015, МБТ Bovis 149	2,0	0	- - - -
3	МБТ Humanis № 2520, МБТ Bovis 149	5,0	30 мин. 1 час 3 часа 1 сут-ки	- - - -	3	МБТ Humanis № 2015, МБТ Bovis 149	5,0	0	- - - -
4	МБТ Humanis № 2520, МБТ Bovis 149	Контроль	-	+	4	МБТ Humanis № 2015, МБТ Bovis 149	Контроль	-	+

Примечание: - (минус) отсутствие роста колонии МБТ
+ (плюс) рост колонии МБТ

В данном направлении при совместном сотрудничестве ученых Узбекского научно-исследовательского института ветеринарии и кафедрой химии природных соединений Узбекского Национального Университета создана новая оригинальная полимерная форма противотуберкулёзного препарата, способствующая повышению воздействия по отношению к моно- и полирезистентным штаммам, а также снижению их отрицательного воздействия на организм. На основе известного противотуберкулёзного препарата - гидразид изоникотиновой кислоты (изониазид), широко используемого в настоящее время при лечении туберкулёза, создан его полимерный аналог. Для этого впервые использована технология молекулярного капсулирования с целью получения супрамолекулярного ком-

плекса тубазида, с производными глицирризиновой кислоты и некоторыми полимерными носителями. Проведено определение специфической активности полученных комплексов как *in vivo*, так и *in vitro*. Для наиболее активного комплекса разработан лабораторный регламент получения субстанции и лекарственной формы, проведены полные доклинические исследования, разработаны проекты временных фармакопейных статей (ВФС) для стандартного образца, субстанции и лекарственной формы. Подготовлены нормативно-технические документы и переданы в Фарм.комитет МЗ РУз для получения разрешения на проведение клинических испытаний.

Требовалось установить эффективность препарата при *in vivo* и *in vitro* экспериментах.

Материалы и методы: Препарат Тубазид-МАСКГ (мономониевая соль глицирризиновой кислоты) была исследована на предмет ее действия на штаммы МБТ Bovis и МБТ Humanis. Для определения специфической активности препарата воспользовались бактериологическим методом путем выращивания микобактерий на питательных средах с различным содержанием концентрации препарата. При этом применяли два метода:

а) прямой метод - посев соответственно обработанного материала на среды, содержащие различные концентрации препарата;

б) непрямой метод - пересев культур микобактерий туберкулеза на среды, содержащие препарат.

Перед опытом приготовили рабочие растворы препарата в следующих концентрациях:

- 1.1%-ный раствор препарата на дистиллированной воде;
- 2.2 %-ный раствор препарата на дистиллированной воде;
- 3.2 %-ный раствор препарата на этаноле;
- 4.5 %-ный раствор препарата на этаноле.

В качестве эталона изучения специфической активности препарата использовали штамм микобактерий человеческого вида - МБТ Humanis № 2015 и штамм МБТ бычьего вида - М. Bovis 149.

Для осуществления прямого бактериологического метода предварительно бактериальную массу штамма МБТ Humanis и М. Bovis 149 поместили в пробирки, где содержались указанные концентрации препарата. После этого бактериальную суспензию на растворе препарата инкубировали в термостате при 37°C в течение 1-3-5 часов и 1 сутки. С истечением срока инкубации бактериальную массу дважды смывали 0,85%-ным физиологическим раствором путем центрифугирования. Из осадка центрифугата сделали посе́вы на питательные среды Гельберга.

При непрямом методе бактериологического исследования специфической активности препарата из культуры МБТ Humanis и М. Bovis 149 сделали пересевы на питательные среды Гельберга с содержанием препарата выше указанных концентраций.

Эксперименты по изучению специфической активности препарата Тубазид-МАСКГ проводили на 24 морских свинках, которые разделили на 8 групп по 3 головы в каждой.

Перед опытом эти морские свинки были исследованы на туберкулез аллергическим методом. Для этого использовали ППД-туберкулин (производство Россия), серия № 3. Срок годности препарата три года. Туберкулин вводили

морским свинкам в дозе 25 ТЕ внутрикожно. Перед введением препарата участок кожи готовили - выстригали шерсть и обрабатывали 70 %-ным спиртом. Учет реакции проводили через 48 часов после введения туберкулина. В результате проведенного исследования не было отмечено положительно реагирующих на ППД-туберкулин животных.

После этого всех морских свинок заражали вирулентными штаммами микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого вида.

Морских свинок 1-й, 2-й 5-й и 7-й групп заражали штаммом М. Humanis № 2015 в дозе 0,03 мг/кг, животных 3-й, 4-й, 6-й и 8-й групп заражали М. bovis -149 в дозе 0,3 мг/кг подкожно.

Через 14 дней после заражения в течение 90 дней опытным животным 1-4-й групп ежедневно начали задавать препарат Тубазид-МАСКГ в дозе 5 и 10 мг/кг, 7-8 группа животных получали препарат изониазид для сравнения эффективности препарата Тубазид-МАСКГ. Контрольные группы животных (5-6 групп) после заражения не получали препарат.

Результаты исследований: Бактериологическим методом изучалось непосредственное влияние препарата Тубазид-МАСКГ на штаммы МБТ хуманис и МБТ бовис. Для этого в стерильных условиях были приготовлены 1,0; 2,0 и 5,0 %-ные растворы препарата Тубазид-МАСКГ. Вышеуказанные штаммы в приготовленных растворах были инкубированы при 37°C в термостате в течение 1, 2, 5 часов, 1 сутки, затем обработаны по методу Гон-Левенштейн-Сумиоши и высажены на питательные среды Гельберга (первый метод). Одновременно растворы препаратов данной концентрации были высажены непосредственно на питательные среды Гельберга (второй метод). В качестве контроля на питательные среды были высажены штаммы МБТ-Хуманис и МБТ бовис без добавления препарата. Наблюдения велись 90 дней.

Таблица 2.

Данные патоморфологических исследований морских свинок зараженных штаммами бовис-149 и МБТ хуманис микобактерий вирулентного туберкулеза с последующим введением препарата Тубазид-МАСКГ.

№ Ж-х	№ группы	Вид животного	Название штамма	Метод заражения и доза мг/кг	Доза Тубазид-МАСКГ	Метод введения препарата	Результаты патоморфологического исследования
1 2 3	1	Морская свинка	МБТ хуманис	0,03 подкожно	5 мг/кг	орально	Изменений, характерных для туберкулеза, нет
1 2 3	2	-/-	-/-	-/-	10 мг/кг	-/-	Изменений, характерных для туберкулеза, нет
1 2 3	3	-/-	МБТ бовис	-/-	5 мг/кг	-/-	Изменений, характерных для туберкулеза, нет
1 2 3	4	-/-	-/-	-/-	10 мг/кг	-/-	Изменений, характерных для туберкулеза, нет
1 2 3	5 Конт- роль	-/-	МБТ хуманис	0,03 подкожно	-	-	Патологический процесс, характерный для туберкулеза
1 2 3	6 Конт- роль	-/-	МБТ бовис	0,03 подкожно	-	-	Патологический процесс, характерный для туберкулеза
1 2 3	7	Морская свинка	МБТ хуманис	0,03 подкожно	Изониазид 10 мг/кг	орально	Изменений, характерных для туберкулеза, нет
1 2 3	8	Морская свинка	МБТ бовис	0,03 подкожно	Изониазид 10 мг/кг	орально	Изменений, характерных для туберкулеза, нет

В результате исследований обнаружено, что в обоих методах обработанных препаратом различных концентраций штамм вирулентного туберкулеза не образуется на питательных средах бактериальной массы, тогда как в контрольной группе было получено множество бактериальных масс.

Результаты определения антибактериальной активности препарата Тубазид-МАСГК бактериологическим методом приведены в таблице 1.

Штаммы, обработанные препаратом и бактериоскопически окрашенные по методу Циля-Нильсена не обнаружены под микроскопом (увеличение 12X90 и 12X100), обнаружены только деструктурные элементы клеток, окрашенные в синий цвет, тогда как в контрольных мазках (без препарата) обнаружены туберкулезные палочки, окрашенные в алый цвет.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что препарат Тубазид-МАСГК оказывает эффективное бактерицидное и бактериостатическое действие на микобактерии вирулентного туберкулеза.

Экспериментальные данные патоморфологических исследований морских свинок, зараженных штаммами МБТ хуманис и бовис-149 микобактерий вирулентного туберкулеза с последующим введением препарата тубазид-МАСГК и контрольной группы, приведены в таблице №2.

Таким образом, во внутренних органах зараженных туберкулезом животных, введенными препаратами тубазид-МАСГК (1-4 группы) и изониазид (7 и 8 группы) не обнаружены патологические процессы, характерные для туберкулеза, и наоборот, во внутренних органах (печени, легких, селезенке, почках и местах заражения) животных контрольной группы выявлены характерные для туберкулеза казеозно-некротические изменения.

В опыте на морских свинках показано, что наиболее эффективной лечебной дозой Тубазид-МАСГК является 10 мг/кг.

Выводы: Таким образом, на основании испытания препарата Тубазид-МАСГК in vitro против возбудителей туберкулеза установлено, что препарат обладает высокой бактериостатической и бактерицидной активностью.

У лабораторных животных, получивших препарат Тубазид-МАСГК, после их заражения возбудителями туберкулеза, установлено, что в их организме туберкулез не развивается.

У морских свинок, зараженных возбудителями туберкулеза, но не получивших препарат Тубазид-МАСГК, наблюдалось выраженное развитие туберкулеза в их внутренних органах.

На основании экспериментальных исследований установлено, что препарат Тубазид-МАСГК в сравнении с изониазидом проявляет ярко выраженную антимикробную активность, что открывает перспективы продолжения исследований в данном направлении.

Список использованной литературы

1. Н. Doudzuk, Introduction to Supramolecular Chemistry. Kluwer Academic Publishers, 2002.
2. Т.В. Романко, Ю.И. Муринов. Некоторые физико-химические свойства глицирризиновой кислоты. Жур. Физ. Химии. 75, № 9, с. 1601 - 1604 (2001).
3. Л.А. Балтика, В.А. Давыдова, И.Г. Чикаева, Р.М. Шаяхметова, А.Р. Капина, Д.Н. Лазарева, Г.А. Толстиков. // Хим.-Фарм. Журн. 22, с. 694 - 697 (1988).
4. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 9-е изд. М. 1987 с. 194-196.
5. Р.М. Кондратенко, Л.А. Балтина, С.Р. Мустафина, А.Ф. Исмаилова, Ф.С. Зарудий, В.А. Давыдова, Г.В. Базекин, Г.Ф. Сулейманова, Г.А. Толстиков. Комплексные соединения глицирризиновой кислоты с противомикробными препаратами. Химико-фармацевтический журнал, 37, № 9, 32, (2003).
6. М. Ito, H. Nakishima, M. Baba. Пат. 63-33332. Япония 1988 (РЖ «Химия» 1992, № 21, Разд. О № ЮЗП).
7. К. Ohtsuki, N. Yakida. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. V.157. p. 507-604.
8. М.М. Азимов, У.Б. Закиров, Ш.Д. Радисанова. // Фармакология и токсикология. 51, с. 91-93 (1988).
9. Заикина Н.А., Ягодкина М.В., Соловский М.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1994. №4. с.48.
10. М.Д. Машковский. Лекарственные средства, Москва, «Медицина», 1978, 2 том, стр. 257-262.
11. Наставление по диагностике туберкулеза животных (Утв. 25.02.1988) - М., 1988. - 43 с.
12. Финкель Е.А., Михайлова Л.В. Биологический метод исследований при туберкулезе. - «Кыргызстан» Фрунзе, С. 118-149.
13. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии - М., «Медицина» - 1971. - с. 171-184.
14. Яценко Т.Н., Мечева И.С. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе. - М.: Медицина, 1973. С. 53-77.

Ж.Ветеринария. №4.2014

Х.К. Бозоров, доцент, А.Б. Абдулакимов, ассистент, СамҚХИ

ИТЛАРНИНГ ЎЛАТ КАСАЛЛИГИДА АГАР ГЕЛИДА ДИФФУЗИЯЛИ ПРЕЦИПИТАЦИЯ РЕАКЦИЯСИНИ ҚҰЙИШ

Аннотация

Анализируя полученные данные реакции диффузной преципитации при чуме плотоядных, есть основание утверждать, что она может быть применена для диагностики этой болезни, а её высокая чувствительность и специфичность позволяют своевременно устанавливать диагноз этих болезней.

Ключевые слова: атипичный, диффузия, агаровый гель, антиген, антитела, преципитация, мертиолят, суспензия, гипериммунизация, филогенетически, вирулентный.

Мавзунинг долзарблиги. Ҳозирги вақтда итларнинг ўлат касаллигида диагноз қўйишда клиник эпизоотологик, патолого-анатомик ва гистологик текширишларга асосланиб қўйилади.

Аммо итларда учрайдиган ўлат касаллигини бир неча мўйнали ҳайвонлар касалликларига ўхшашлик томонлари мавжуд. Касаллик атипик ва аралаш кечганда айрим ҳолларда диагноз қўйиш мумкин бўлмасдан қолади.

Summary

Analyzing the obtained data on the reaction of diffuse precipitation at the plague of carnivorous, there is the reason to ascertain that it can be applied for diagnosis of this disease, and its high sensibility and specificity allow the timely establishing the falling with these diseases.

Key words: a typical, diffusion, agar helium, antigen, antibodies, precipitation, mertriolate, suspension, hyperimmunization, phylogenetically, virulent.

Диагностик намуна учун сезгир ҳайвонларга вирус сакловчи патологик материални юктириш унча тақомиллашмаган ҳисобланади, чунки итлар, тулкилар ўртасида итларнинг ўлат вирусига сезгир бўлмаганлари қўпчиликни ташкил этади. Вирусологик текширувларнинг серологик усуллари: гемагглютинация реакцияси, гемагглютинацияни тўхтатиш, комплементни боғлаш, ўстирилган ҳужайраларда ўтказиладиган нейтраллаш