

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА ЙОГО ОСОБЛИВОСТІ У МОРСЬКИХ СВИНОК ЗА ВВЕДЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ ТА ГКП-305

*В. В. Зажарський¹, канд. вет. наук, доцент,
П. О. Давиденко¹, канд. вет. наук, доцент
О. Г. Гаврилiна¹, канд. вет. наук, доцент
В. В. Парченко², д-р фарм. наук, професор,
А. С. Гоцуля², канд. фарм. наук, доцент*

¹Дніпровський державний аграрно-економічний університет
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600, Україна

²Запорізький державний медичний університет
просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69000 Україна

У роботі представлені результати клінічних, патологоанатомічних та гістологічних досліджень туберкульозного запалення та неспецифічних змін органів морських свинок в експериментальній моделі туберкульозу за порівняльного лікування ізоніазидом та ГКП-305 (N'-(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-R-4H-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду). Визначене оптимальне місце введення препарату ГКП-305.

Ключові слова: ТУБЕРКУЛЬОЗ, ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ, ЛІКУВАННЯ, ПРЕПАРАТ ГКП-305 (N'-(2-(5-((ТЕОФІЛІН-7-ІЛ)МЕТИЛ)-4-R-4H-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛТІО)АЦЕТИЛ)ІЗОНІКОТИНОГІДРАЗИДУ), ІЗОНІАЗИД, ЗМІНИ.

Первинна резистентність виникає, коли людина заражається стійким до ліків штамом туберкульозу. У людини, у якій немає резистентності до ліків, протягом лікування може розвинути вторинна (придбана) резистентність. Остання може розвинути через неадекватне лікування, недотримання належним чином призначеного режиму (недотримання режиму) або приймання неякісних лікарських засобів [1]. Резистентний туберкульоз є серйозною проблемою охорони здоров'я населення у багатьох країнах, що розвиваються. Лікування такого туберкульозу займає більше часу та потребує дорожчих ліків. MDR-TB – це туберкульоз, на який не діють два найефективніші лікарські засоби: рифампіцин та ізоніазид.

Проблема побічної дії ксенобіотиків та протидії їх токсичним проявам залишається вкрай важливою. Проблема лікування хворих на туберкульоз має значну наукову і соціальну значимість в умовах глобальної епідемії цього захворювання в світі, і в тому числі в Україні [2-13].

У роботі розглядаються актуальні питання порівняльної ефективності лікування ізоніазидом та ГКП-305 хворих на туберкульоз в модельному експерименті на прикладі морських свинок, уражених штамом мікобактерій туберкульозу.

Мета роботи – вивчення процесу моделювання туберкульозу та його особливості у морських свинок для подальшого використання результатів експерименту у лікувальній та науковій практиці.

Матеріали і методи. Дослідження виконані в лабораторії гістології, імуноцитохімії та патоморфології НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського державного аграрно-економічного університету та навчально-науковій лабораторії з вивчення епізоотології та інфекційного процесу туберкульозу та мікобактеріозів тварин

ДДАЕУ. Для експерименту взяли 18 морських свинок середньою вагою 250 г. Було сформовано 4 групи із трьох тварин.

Препарат вводили так:

1-а група: ізоніазид в дозі 10 мг/кг маси тварини – загальноприйнята доза для лікування цим препаратом (внутрішньо через ротову порожнину);

2-а група: ізоніазид в дозі 10 мг/кг маси тварини підшкірно;

3-я група: ГКП-305 (схема синтезу) в дозі 10 мг/кг маси тварини внутрішньо через ротову порожнину;

4-а група: ГКП-305 в дозі 10 мг/кг маси тварини підшкірно. Тривалість лікування становила 90 діб.

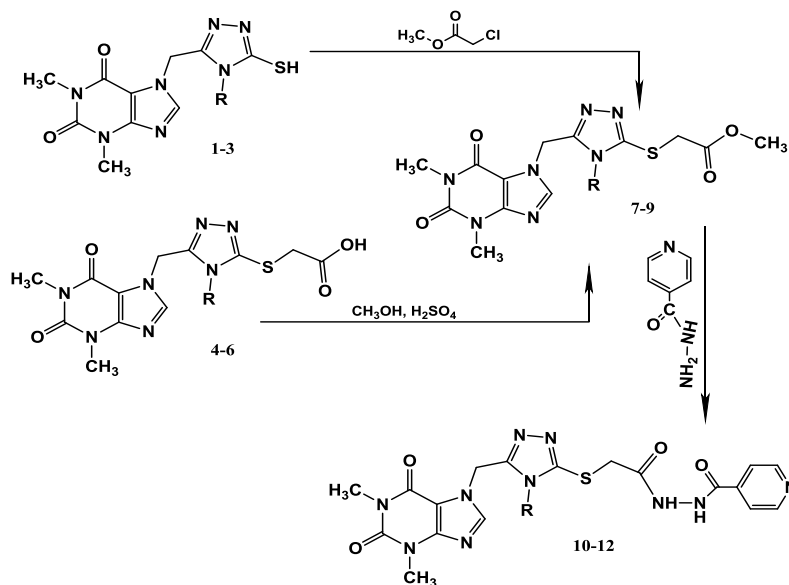


Схема. Синтез ГКП-305:

N'-(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-*R*-4*H*-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду

Контрольна група: морські свинки без лікування (тест на виживання – Кхв); а також клінічно здорові тварини (Кзд).

Зараження тварин проводили шляхом підшкірного введення *M. bovis* 100 пасажу в дозі 0,01 мг вологої ваги в об'ємі 0,5 см³ фізіологічного розчину натрій хлориду.

Під час проведення розтину тварин, оцінювали макроскопічні туберкульозні ураження в у.о. для кожної окремо взятої свинки. Для гістологічного дослідження у кожній свинки брали регіонарні до місця зараження лімфовузли, шматочки селезінки, печінки, легень, а також нирку та поміщали їх у 10 % розчин формаліну.

Патологоанатомічний розтин проводили методом повної евісцерації за Г. В. Шором. Для патогістологічного дослідження матеріал відбирали одразу після розтину, метод забарвлення гематоксиліном та еозином. Отримані гістопрепарати досліджували за допомогою мікроскопу Leica DM1000. Фотофіксація гістопрепаратів проводили цифровою фотокамерою Leica DFC 295.

Вивчення біохімічних показників крові проводили за допомогою фотометрів «Microlab-200» та «Vitalab Eclipse» (Merck, Німеччина) із програмним забезпеченням після постановки реакції відповідними діагностичними тест-наборами фірм «Lachema» Чехія) і «Ольвекс» (СПб) (Меньшиков В. В, 1982; Алексеев В. В. с соавт., 1992; Назаренко Г. И., 1997; Тиц Н. У., 1997; Колгаров И. Ф. с соавт., 1999; Маршал В. Дж., 2000, Данилова Л. А., 2003).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомоги комп'ютерної програми Microsoft Office Excel.

Результати й обговорення. При відтворенні туберкульозу у морських свинок контрольної групи візуально спостерігали виразки на місці введення культури (рис.1).



Рис. 1. Виразки на місці введення культури *M. bovis* 100 пасажу (контроль – заражена тварина).

У легенях, печінці, нирках та селезінці розвивається значний специфічний запальний процес з формуванням епітеліоїдноклітинних гранульом, які включають багатоядерні клітини, крім того спостерігаються казеозно-некротичні та дистрофічні зміни (рис. 2-4).



Рис. 2. Вогнища специфічного запалення (контроль – заражена тварина).



Рис. 3. Осередки первинної пневмонії в легенях з гранульомними явищами некрозу в центрі, перифокальне запалення та туберкульозні бугорки (контроль – заражена тварина).

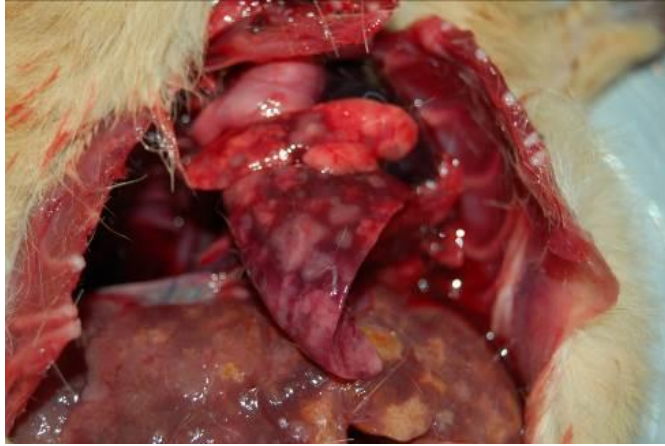


Рис .4. Туберкули на печінці морської свинки (контроль – заражена тварина).

Нами не виявлено патологоанатомічних змін у клінічно здорових тварин (рис. 5-7). Вогнища специфічного запалення складаються переважно з епітеліоїдних та лімфоїдних клітин, серед яких визначаються поодинокі гігантські багатоядерні клітини типу Пирогова-Лангганса. Крім того, зустрічаються гістіоцити та плазматичні клітини з ексцентрично розташованими ядрами, поодинокі одноядерні макрофаги.

У препаратах печінки дистрофічні зміни гепатоцитів, вогнища специфічного запалення з казеозним некрозом, по периферії яких визначаються лімфоїдно- та епітеліоїдноклітинні інфільтрати та гігантські багатоядерні макрофаги (рис. 8).



Рис. 5. Печінка без патологічних змін (контроль – клінічно здорова тварина).



Рис. 6. Легені без патологічних змін (контроль – клінічно здорова тварина).

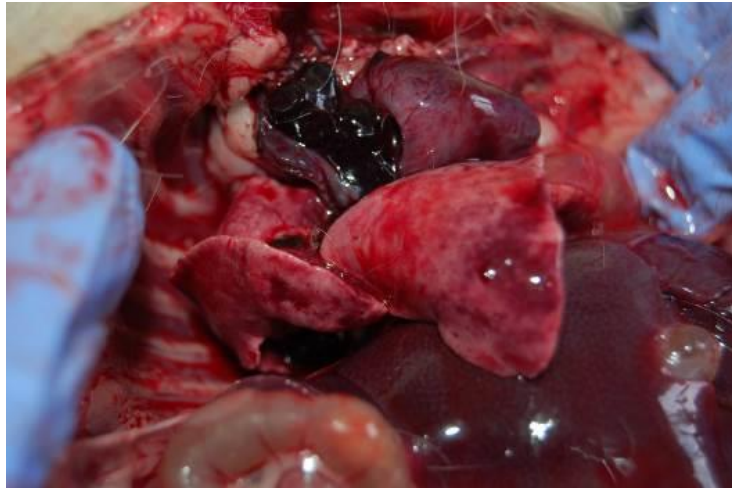


Рис 7. Серце і селезінка без патологічних змін (контроль – клінічно здорова тварина).

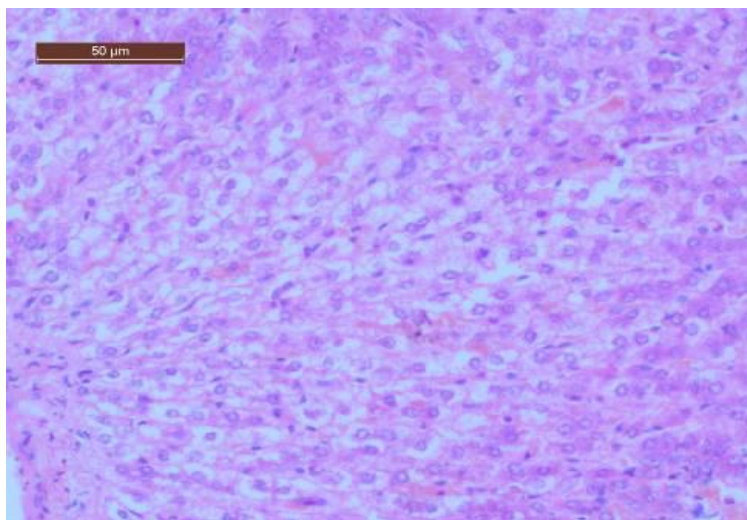


Рис. 8. Дистрофічні зміни гепатоцитів, вогнища специфічного запалення з казеозним некрозом (контроль – заражена тварина); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x200.

Виражені дистрофічні зміни епітелію прямих канальців. В зоні прямих канальців визначаються гігантські багатоядерні клітини типу Пирогова-Ланхганса, що свідчить про значні туберкульозні зміни у нирках (рис. 9).

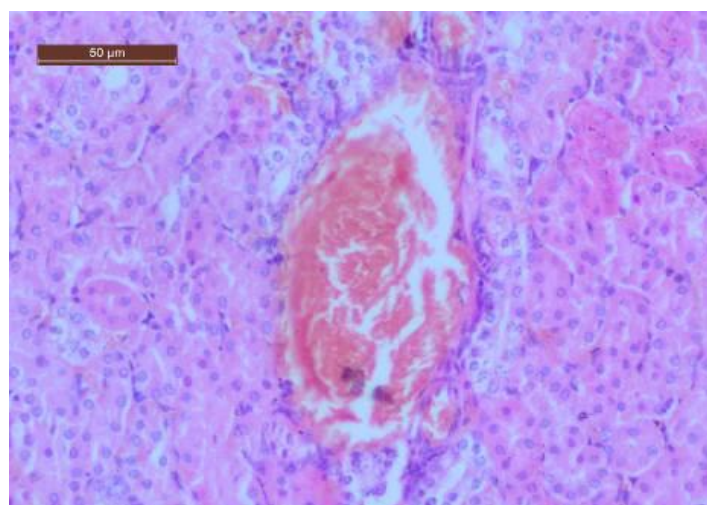


Рис. 9. Дистрофічні зміни епітелію прямих канальців- гігантські багатоядерні клітини типу Пирогова-Ланхганса (контроль – заражена тварина); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x200.

Тканина селезінки містить чисельні вогнища туберкульозного запалення у вигляді зон казеозного некрозу (рис. 10). По периферії вогнищ зустрічаються великі багатоядерні макрофаги типу клітин Пирогова-Лангханса, що свідчить про виражене специфічне запалення.

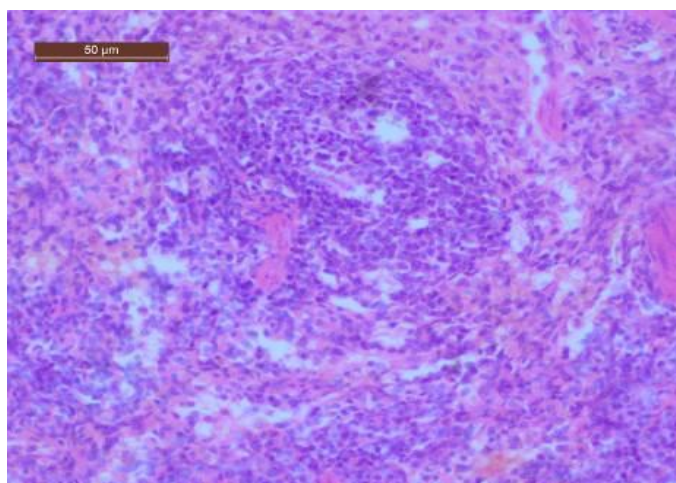


Рис. 10. Зони казеозного некрозу тканини селезінки (контроль – заражена тварина); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x200.

Патологічні зміни в органах тварин, заражених *M. bovis* 100 пасажу, наведені в таблиці.

Аналізуючи таблицю, нами визначено, що в організмі тварин, заражених *M. bovis* 100 пасажу (контроль) відбуваються характерні патологічні зміни – в легенях осередки первинної пневмонії з гранульомними явищами некрозу в центрі, періфокальне запалення та туберкульозні бугорки. В печінці виявлена жирова інфільтрація та жирова дегенерація, виявлені дифузні та вузликові гістіолімфоцитарні інфільтрати, неспецифічні васкуліти. Тканина селезінки містить багаточисельні вогнища туберкульозного запалення у вигляді зон казеозного некрозу. По периферії вогнищ зустрічаються великі багатоядерні макрофаги типу клітин Пирогова-Лангханса, що свідчить про виражене специфічне запалення. В селезінці бугорковий (міліарний туберкульоз), крупноосередковані зміни, туберкульозна спленомегалія, амілоїдоз.

Також виявлені патологічні зміни в лімфатичних вузлах та нирках. Так, в лімфатичних вузлах спостерігаються запальні вогнища з наявністю гігантських клітин Пирогова-Лангханса витягнутої форми та епітеліальних клітин, типових для інфекційних гранулом; а в нирках - осередки круглоклітинної інфільтрації, зони росту сполучнотканинної капсули, склероз судин, гіаліноз, зернисті та жирові переродження каналців. Зміни носять характер вузликових гістіолімфоцитарних інфільтратів, в клубочках інфільтрація та некроз епітелію капілярів.

Нами проведений порівняльний аналіз впливу 1 % розчину ізоніазиду та ГКП-305 на організм мурчаків, заражених *M. bovis* 100 пасажу, при різних способах лікування (підшкірно та внутрішньо). За результатами спостереження протягом 90 днів нами виявлено, що при внутрішньому застосуванні ізоніазиду в легенях осередки первинної пневмонії – в центрі гранульоми явища некрозу, а навколо спостерігається періфокальне запалення та туберкульозні бугорки (рис. 11, 12); в печінці - жирова дистрофія гепатоцитів (рис. 13); в селезінці незначні осередки казеозного некрозу, спленомегалія. В лімфатичних вузлах виявляли запальні вогнища з наявністю гігантських клітин Пирогова-Лангханса; в нирках - жирова дистрофія звивистих каналців (рис. 14). На нашу думку такий метод застосування ізоніазиду приводить до інтоксикації організму хворої тварини, хоча і виявлений туберкулостатичний ефект по відношенню до контрольної групи (заражені тварини).

Патологічні зміни в органах тварин, заражених *M.bovis* 100 пасажу

| Проби органів, відібраних від тварин | Групи тварин | | | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--|-------------------------------------|
| | Ізоніазид (per os) | Ізоніазид (підшкірно) | ГКП-305 (per os) | ГКП-305 (підшкірно) | Контроль (заражені тварини) | Контроль (клінічно здорові тварини) |
| Легені | осередки первинної пневмонії – в центрі гранульоми, явища некрозу, а навколо – періфокальне запалення та туберкульозні бугорки | без патологічних змін | без патологічних змін | без патологічних змін | осередки первинної пневмонії – в центрі гранульоми явища некрозу, а навколо спостерігається періфокальне запалення та туберкульозні бугорки | без патологічних змін |
| Печінка | жирова дистрофія гепатоцитів | жирова дистрофія гепатоцитів | білкова дистрофія гепатоцитів | без патологічних змін | жирова інфільтрація та жирова дегенерація, дифузні та вузликові гістіолімфоцитарні інфільтрати, неспецифічні васкулити | без патологічних змін |
| Селезінка | незначні осередки казеозного некрозу, спленомегалія | без патологічних змін | без патологічних змін | без патологічних змін | бугорковий (міліарний туберкульоз), крупно-осередковані зміни, туберкульозна спленомегалія, амілоїдоз | без патологічних змін |
| Лімфатичні вузли | запальні вогнища з наявністю гігантських клітин Пирогова-Лангханса | без патологічних змін | без патологічних змін | без патологічних змін | запальні вогнища з наявністю гігантських клітин Пирогова-Лангханса витягнутої форми та епітеліальних клітин, типових для інфекційних гранулом | без патологічних змін |
| Нирки | жирова дистрофія звивистих каналців | білкова дистрофія звивистих каналців | білкова дистрофія звивистих каналців | без патологічних змін | осередки круглоклітинної інфільтрації, зони росту сполучнотканинної капсули, склероз судин нирки, гіаліноз, зернисті та жирові переродження каналців. Зміни носять характер вузликових гістіолімфоцитарних інфільтратів, в нирках – різкий застій, в клубочках інфільтрація та некроз епітелію капілярів | без патологічних змін |

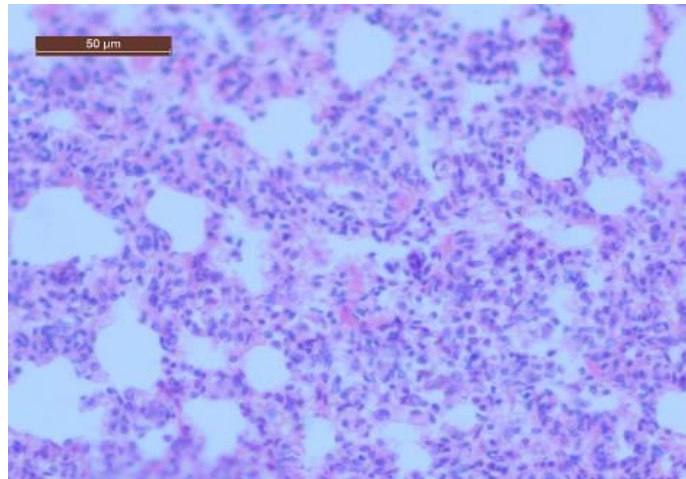


Рис. 11. Осередки первинної пневмонії в легенях, гранульоми явища некрозу (Ізоніазид, внутрішнє застосування); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x200.

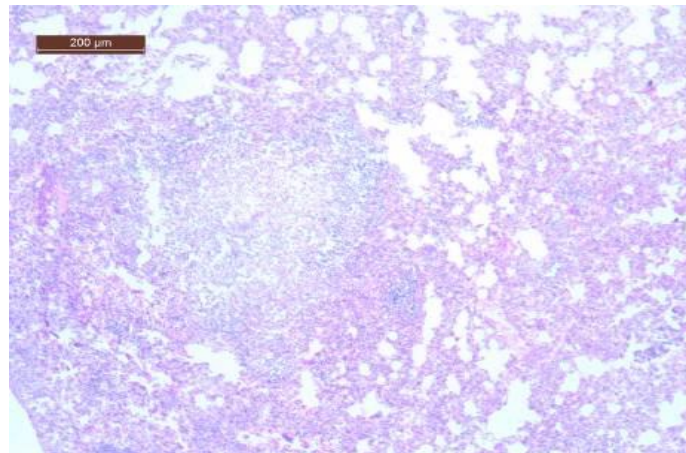


Рис. 12 Перифокальне запалення та туберкульозні бугорки в легенях (Ізоніазид, внутрішнє застосування); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x40.

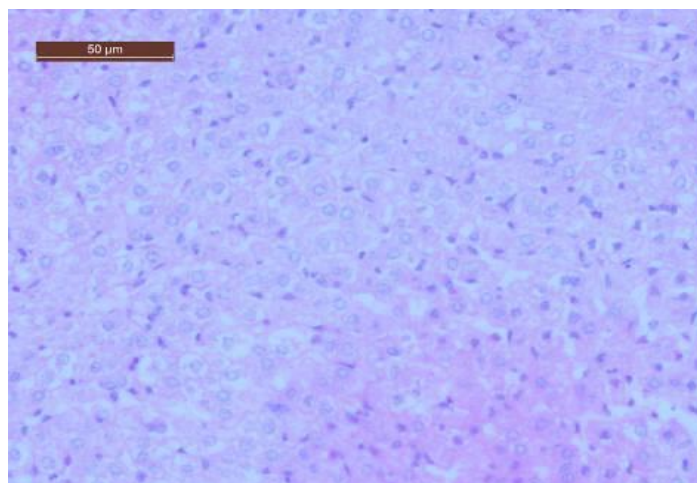


Рис. 13. Жирова дистрофія гепатоцитів (Ізоніазид, внутрішнє застосування); (гістологічний зріз). Гематоксилін-еозин, x200.

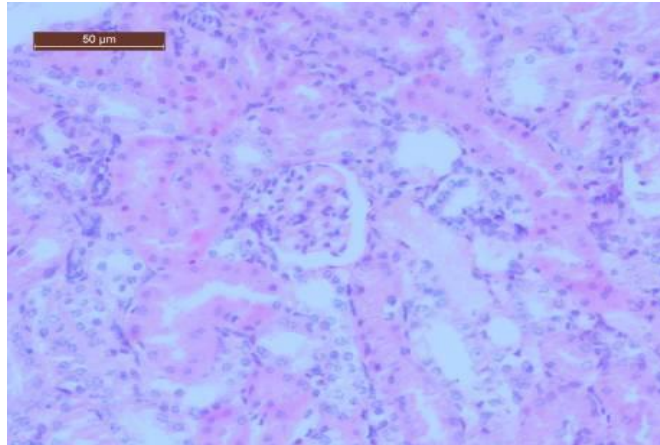


Рис. 14. Осередки казеозного некрозу в нирках (Ізоніазид, внутрішнє застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200.

Отже лікування ізоніазидом значно зменшило інтенсивність туберкульозного ураження, але повністю його не ліквідувало, що підтверджувалося наявністю невеликих вогнищ туберкульозного ураження в легенях, лімфатичних вузлах та селезінці. Застосування ізоніазиду підшкірно тварині, зараженій *M. bovis* 100 пасажу призвело до постійного туберкулостатичного впливу: в легенях, селезінці, лімфатичних вузлах нами не виявлені патологічних змін, характерних до туберкульозних уражень, хоча в печінці виявили жирову дистрофію гепатоцитів, а в нирках - білкову дистрофію звивистих канальців (рис. 15).

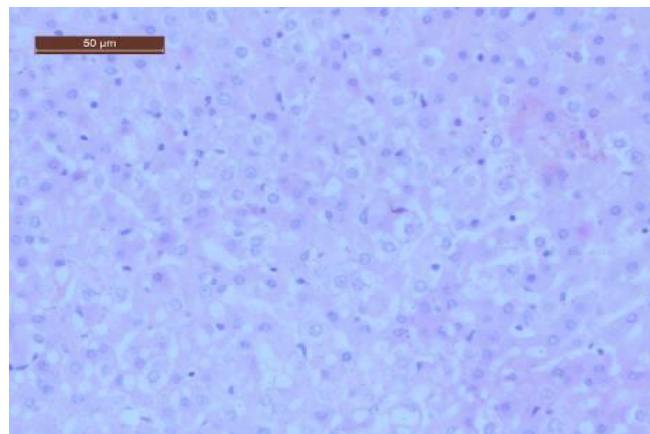


Рис. 15. Жирова дистрофія гепатоцитів (Ізоніазид, підшкірне застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200.

Позитивні результати отримані при застосуванні препарату ГКП-305, при чому навіть використання 1% розчину внутрішньо впливає туберкулостатично, лише в печінці та нирках незначна білкова дистрофія гепатоцитів та звивистих канальців (рис. 16).

Підшкірне введення препарату ГКП-305 підтверджує володіння туберкулостатичним ефектом краще, ніж ізоніазид, без патологічних змін в легенях, печінці, селезінці, лімфатичних вузлах та нирках (рис. 17-20).

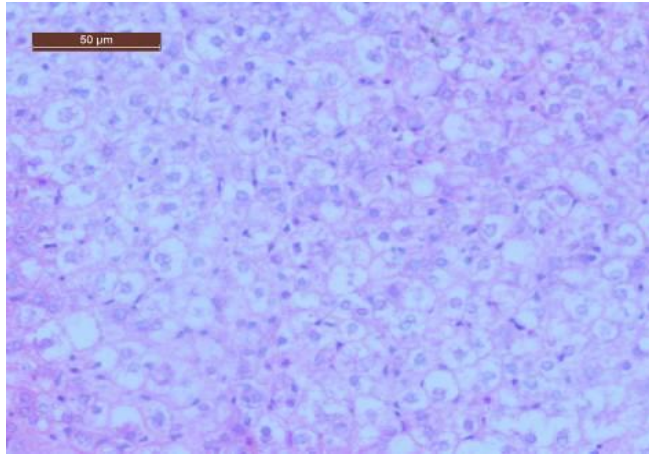


Рис. 16. Білкова дистрофія гепатоцитів (препарат ГКП-305, внутрішнє застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200

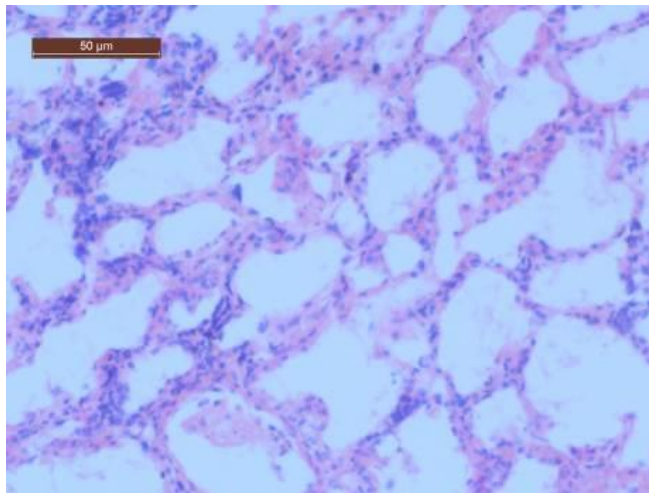


Рис. 17. Легені тварини (препарат ГКП-305, підшкірне застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200

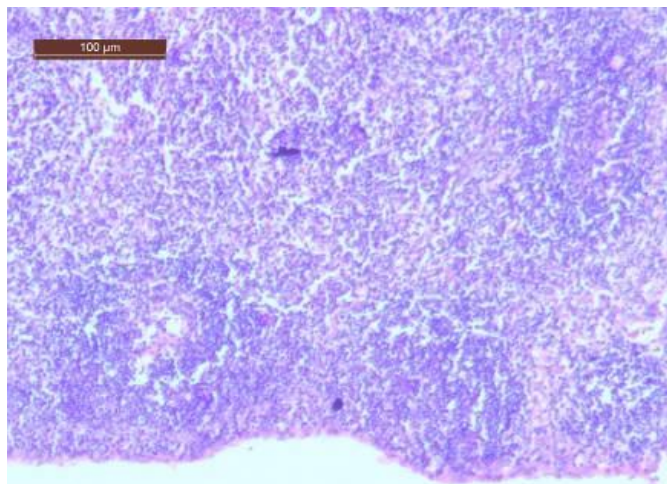


Рис. 18. Лімфатичний вузол тварини (препарат ГКП-305, підшкірне застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x100

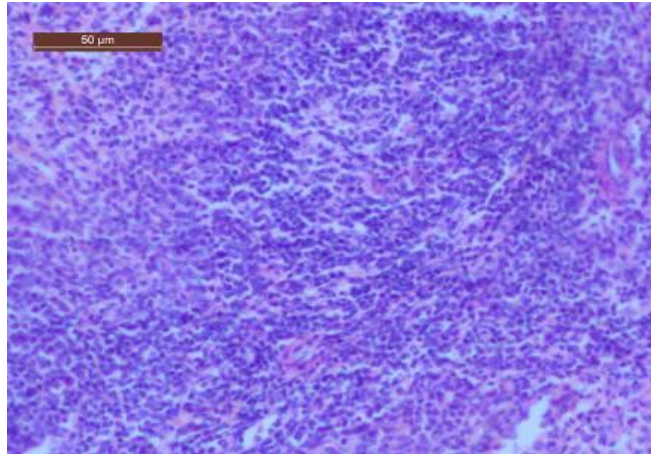


Рис. 19. Селезінка тварини (препарат ГКП-305, підшкірне застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200

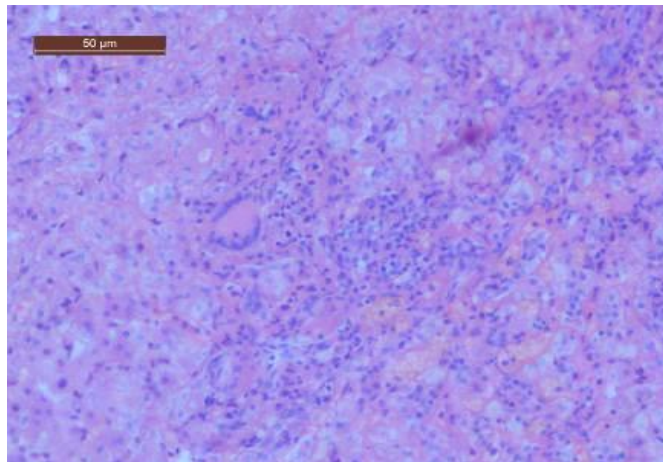


Рис. 20. Печінка тварини (препарат ГКП-305, підшкірне застосування); (гістологічний зріз).
Гематоксилін-еозин, x200

В И С Н О В К И

Наведені приклади представляють результати клінічних, патологоанатомічних та гістологічних досліджень ознак туберкульозного запалення та неспецифічних змін в органах морських свинок з експериментальною моделлю туберкульозу при порівняльному аналізі лікування ізоніазидом та ГКП-305 за різним місцем введення. В умовах експерименту підшкірне введення ГКП-305 в дозі 10 мг/кг маси тварини призводить до відсутності специфічних та неспецифічних проявів запалення в легенях, печінці, нирках та селезінці.

Перспективи досліджень. Триватиме вивчення ефективності теофільних препаратів в умовах виробництва.

EXPERIMENTAL DESIGN OF TUBERCULOSIS AND HIS FEATURE FOR GUINEA-PIGS FOR INTRODUCTION OF ISONIAZIDUM AND GKP- 305

V. V. Zazharskiy¹, P. O. Davydenko¹, O. G. Gavrilina¹, V. V. Parchenco², A. S. Gotzula²

¹Dnipro State Agrarian and Economic University
25, Sergia Efremova str., Dnipro, 49600, Ukraine

²Zaporizhzhya State Medical University
26, boulevard Majakovskogo, Zaporizhzhya, 69000, Ukraine

S U M M A R Y

The paper presents the results of clinical, pathoanatomical and histological studies of tuberculous inflammation and non-specific changes in guinea pig organs in the experimental model of tuberculosis in the comparative treatment of isoniazid and GCP-305. The optimum place of introduction of the drug GCP-305 has been determined.

Keywords: TUBERCULOSIS, MODEL, TREATMENT, PREPARATION GCP-305, ISONIAZID, EXPERIMENT, CHANGES.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И ЕГО ОСОБЕННОСТИ У МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ВВЕДЕНИИ ИЗОНИАЗИДА И ГКП- 305

В. В. Зажарский¹, П. А. Давыденко¹, Е. Г. Гаврилина¹, В. В. Парченко², А. С. Гоцуля²

¹Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет
ул. Сергея Ефремова, 25, г. Днепр, 49600, Украина

²Запорожский государственный медицинский университет
просп. Маяковского, 26, г. Запорожье, 69000, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В работе представлены результаты клинических, патологоанатомических и гистологических исследований туберкулезного воспаления и неспецифических изменений органов морских свинок в экспериментальной модели туберкулеза при сравнительном лечении изониазида и ГКП-305. Определено оптимальное место введения препарата ГКП-305.

Ключевые слова: ТУБЕРКУЛЕЗ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ, ЛЕЧЕНИЕ, ПРЕПАРАТ ГКП-305, ИЗОНИАЗИД, ИЗМЕНЕНИЯ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Ahmad S.* Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis [Text] / S. Ahmad, E. Mokaddas // *Respir. Med.* – 2009. – Vol. 103. – P. 1777-1790.
2. *De la Rua-Domenech R.* Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis [Text] / R. de la Rua-Domenech // *Tuberculosis (Edinb).* – 2006. – Vol. 86. – P. 77-109.
3. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa [Text] / W. Y. Ayele, S. D. Neill, J. Zinsstag [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2004. – Vol. 8. – P. 924-937.
4. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States [Text] / T. C. Rodwell, M. Moore, K. S. Moser [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 909-916.
5. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back [Text] / A. Fritsche, R. Engel, D. Bhul [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2004. – Vol. 8. – P. 903–904.
6. Akpabio U. A review on bovine tuberculosis [Text] / U. Akpabio // *J. Vet. Adv.* – 2015. – Vol. 5 (3). – P. 841-847.
7. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication [Text] / I. Schiller, B. Oesch, H. M. Vordermeier [et al.] // *Transbound. Emerg. Dis.* – 2010. – Vol. 57. – P. 205-220.

8 Морфологія та культуральні властивості дисоціативних форм *Mycobacterium bovis* культивованих за 3 та 37° С [Текст] / О. М. Кулішенко, П. О. Давиденко, О. А. Ткаченко [та ін.] // Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. – 2015. – Т. 3, № 1 (49). – С. 88-93.

9. Вплив препарату 5-тієніл-1,2,4-триазолін-3тіону на морфологію, тинкторіальні властивості патогенних та дисоціативних форм *M. bovis* [Текст] / О. А. Ткаченко, В. В. Зажарський, П. О. Давиденко [та ін.] // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 91-100.

10. The influence of GKP-305 on the cultural properties of *M. bovis* of pathogenic strains and dissociative forms [Text] / V. Zazharskiy, P. Davydenko, I. Biben [et al.] // НТБ НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2014. – № 3, Т. 2. – С. 90-94.

11. Biological properties of dissociative L-and other forms of *Mycobacterium bovis* [Text] / О. А. Tkachenko, P. O. Davydenko, V. V. Zazharskiy [et al.] // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2016. – Т. 24, вип. 2. – С. 338-346.

12. Synthesis and research of the impact of new derivatives of 4-R-3- (morpholinomethyl)-4H-1, 2, 4-triazole-5-thiol on cultural attributes of pathogenic *M. bovis* [Text] / R. Shcherbyna, V. Parchenko, A. Safonov [et al.] // Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci., 2018. – 9 (2). – P. 70-79.

13. Порівняльна оцінка культуральних властивостей *M. bovis* за дії різних концентрацій ПГКП-135 та ізоніазиду / В. В. Зажарський, П. О. Давиденко, О. М. Кулішенко [та ін.] // Науково-теоретичний збірник Житомирського національного агроекологічного університету, 2017. – Випуск 2 (63). – т.3. – С. 93–100.

Рецензент – П. М. Складар, д. вет. н., професор, ДДАЕУ.