

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОРИФАМПИЦИНА НА МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА И МАКРОФАГАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

ЕРОХИНА М. В.^{1,2}, РЫБАЛКИНА Е. Ю.¹, БАСЕРГЯН Г. Г.³, ОНИЩЕНКО Г. Е.², ЛЕПЕХА Л. Н.¹

CYTOTOXIC ACTION OF NANO-RIFAMPICIN ON MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS AND HUMAN MACROPHAGES

YEROKHINA M. V.^{1,2}, RYBALKINA E. YU.¹, BASERGYAN G. G.³, ONISHHENKO G. E.², LEPEKHA L. N.¹

¹ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», г. Москва

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва

³НИИ молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова»

¹Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, RF

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, RF

³Research Institute of Molecular Medicine by I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, RF

Идеология создания наноформы рифампицина (NRFM) предполагает использование молекулярных субстанций, направленных на усиление адресной доставки лекарственного агента и накопление его внутри инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ) макрофагов. Внутриклеточными мишенями для NRFM являются РНК-полимеразы МБТ и митохондрий.

Цель: изучить цитотоксическое действие NRFM на МБТ штамма БЦЖ и макрофагальные клетки человека.

Материалы и методы. Препарат NRFM представляет собой сферы биodeградируемого и разрешенного к медицинскому применению полимера молочной кислоты (PLA), содержащий рифампицин (RFM) в массовой доле 8% (создан в НИИ молекулярной медицины, Россия). Размер сфер составляет 305 ± 69 нм. В качестве RFM использовали чистую субстанцию препарата (Sigma). Жизнеспособность клеток при действии NRFM определяли с помощью МТТ-теста; экспериментальные концентрации препарата протестированы в диапазоне 0,1-500,0 мкг/мл (0,008-40,000 мкг/мл чистого RFM в составе NRFM), срок эксперимента – 72 ч; МТТ-тест проведен в сравнении с действием RFM и чистой субстанции PLA на клеточной линии ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека). На основе данных МТТ-теста получены индексы цитотоксичности (IC) гибели 30 и 50% клеточной популяции (IC₃₀ и IC₅₀ соответственно).

Для исследования структуры хондриома использовали метод прижизненного окрашивания (краситель MitoTracer Orange). Индукция апоптозной гибели клеток с участием митохондрий проанализирована при помощи иммуноцитохимического окрашивания (первый антитела к цитохрому c, второй антитела мечены флуорохромом Alexa 488). Анализ препаратов проведен при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

МБТ штамма БЦЖ, трансфицированные белком GFP, добавлены в среду культивирования макрофагальных клеток линии ТНР-1 на 24 ч, после чего была проведена смена среды культивирования и добавлена свежая среда, содержащая 50 и 100 мкг/мл нанорифампицина на 72 ч. Для выявления внутриклеточных нежизнеспособных микобактерий использовали краситель йодид пропидия (клетки предварительно обрабатывали раствором 1% Triton X-100).

Pgp – один из основных белков множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) клеток моноцитарного происхождения. Локализуется на плазматической мембране клеток и работает как помпа, использующая энергию АТФ для транспорта лекарственных препаратов из цитоплазмы во внеклеточную среду. Выброс родамина 123 является функциональным тестом на активность Pgp при действии различных лекарственных препаратов. Снижение (блок) выброса родамина 123 свидетельствует о конкурентном связывании с Pgp лекарственного агента. Действие NRFM (50 и 100 мкг/мл) на выброс родамина 123 протестировано на клетках человека линии KG1, характеризующейся выраженной экспрессией Pgp (острая миелогенная лейкемия человека) методом проточной флуориметрии.

Результаты. Полученные МТТ-тестом данные показали, что NRFM достоверно не снижает процент жизнеспособных макрофагальных клеток линии ТНР-1 во всем диапазоне протестированных концентраций. Жизнеспособность клеток в присутствии чистого PLA также не изменялась. Концентрации чистого RFM в диапазоне 0,008-40,000 мкг/мл не являются токсичными для макрофагальных клеток. В более высоких диапазонах концентраций (50-500 мкг/мл) индексы цитотоксичности RFM для макрофагальных клеток составляют: IC₃₀ – 200-250 мкг/мл, IC₅₀ – 500-550 мкг/мл, т. е. увеличение концентрации RFM приводит к гибели части клеточной популяции.

Выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму свидетельствует об индукции апоптозной гибели клеток при повреждении митохондрий. При действии NRFM доля клеток, характеризующихся диффузным распределением цитохрома с, увеличивается до 2% (против 0,1-0,5% в контроле). При этом прижизненное окрашивание митохондрий показало, что в большинстве клеток NRFM (50 и 100 мкг/мл) не вызывает изменений в структуре сети митохондрий.

Анализ влияния NRFM на внутриклеточные и внеклеточные формы БЦЖ показал, что МБТ, локализующиеся внутри макрофагальных клеток, гибнут при воздействии NRFM, о чем свидетельствует их окрашивание йодидом пропидия. Внеклеточные формы МБТ не окрашиваются йодидом пропидия после воздействия NRFM, т. е. сохраняют свою жизнеспособность.

Показано, что концентрация 50 мкг/мл оказывает незначительное влияние на выброс ро-

дамина 123, тогда как при действии 100 мкг/мл происходит полный блок активности белка Pgp. Проведенное отдельное тестирование действия полимера молочной кислоты показало, что PLA в отсутствие рифампицина не влияет на выброс родамина 123. Чистая субстанция рифампицина (10 мкг/мл) вызывает частичный блок выброса родамина 123.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нанорифампицин:

1) не является токсичным для популяции макрофагальных клеток в целом, гибель небольшой ее части идет по митохондриальному пути апоптоза;

2) является наиболее активным против внутриклеточных форм МБТ;

3) влияет на функциональную активность белка Pgp, что свидетельствует о его связывании с данным белком и указывает на возможность формирования устойчивости к рифампицину.

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

ЖУКОВА Е. М., БАРАНЧУКОВА А. А.

OPTIMIZATION OF DETECTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

ZHUKOVA E. M., BARANCHUKOVA A. A.

ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулеза» МЗ РФ, г. Новосибирск

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, RF

Цель: разработка подходов к ранней диагностике хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у больных туберкулезом легких (ТЛ) путем изучения взаимосвязи клинических проявлений и функциональных маркеров обструкции бронхов (ОБ).

Материалы и методы. Наблюдались 254 больных ТЛ: у 17 – диагностирован очаговый ТЛ, у 186 – инфильтративный, у 20 – диссеминированный, у 15 – фиброзно-кавернозный, у 12 – казеозная пневмония и у 4 – туберкулема. У 59,8% пациентов процесс в легких был распространенным, деструктивные изменения обнаружены в 69,7% случаях. Проводили анкетирование пациентов по разработанному опроснику основных респираторных симптомов (РС), который включал блок вопросов о наличии неспецифических этиологических факторов, ведущих к формированию ХОБЛ: наследственной предрасположенности по заболеваниям легких, ингаляционных воздействий (табачного дыма, про-

фессиональных пылей, загрязнения воздуха внутри помещения из-за печного отопления); о возрасте, половой принадлежности, социально-экономическом статусе, питании пациента, статусе курения; о наличии, длительности и выраженности РС, физикальных изменений (ФИ). Диагностика нарушений бронхиальной проходимости включала, помимо спирографии, регистрации кривой П-ОФВ, исследование вязкостного дыхательного сопротивления методом форсированных осцилляций (МФО). Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) проводили на спироанализаторе Custo vit фирмы Custo med (Германия). Статистическую обработку данных выполняли в пакете SPSS 12.0 (SPSS Inc.). При создании базы данных использовали редактор электронных таблиц MS Excel 7.0. Достоверность различий проверяли при помощи χ^2 Пирсона, U-критерия Манна – Уитни. Статистическая значимость различий принималась при $p < 0,05$.