

И.П. Зиновьев<sup>1</sup>, Н.В. Поздеева<sup>1</sup>, Е.Л. Беляева<sup>1</sup>, Н.А. Эсаулова<sup>2</sup>, В.Г. Новиков<sup>2</sup>

**БАРЬЕРНЫЙ МЕХАНИЗМ В ВОЗНИКНОВЕНИИ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ  
ТУБЕРКУЛЕЗА ПРИ ИНТЕНСИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

<sup>1</sup>*Кировская государственная медицинская академия*

<sup>2</sup>*КОГКУЗ КОПТД*

I.P. Zinoviev<sup>1</sup>, N.V. Pozdeyeva<sup>1</sup>, Ye.L. Belyaeva<sup>1</sup>, N.A. Esaulova<sup>2</sup>, V.G. Novikov<sup>2</sup>

**BARRIER MECHANISM OF DRUG RESISTANCE DEVELOPMENT  
IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DURING INTENSIVE  
CHEMOTHERAPY**

<sup>1</sup>*Kirov state medical academy*

<sup>2</sup>*Kirov regional clinical TB dispensary*

В 2009–2011 гг. у 126 больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулёзом лёгких с бактериовыделением изучена структура и динамика первичной и вторичной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Интенсивная химиотерапия в течение 6 месяцев оказалась эффективной у 77,8% больных. Доказано, что в интенсивную фазу химиотерапии у больных с первичной лекарственной устойчивостью определяется развитие вторичного иммунодефицита, с достоверным уменьшением  $CD_4^+$ -,  $CD_8^+$ -лимфоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов. Вторичный иммунодефицит авторы объясняют ускоренным индуцированным апоптозом. В возникновении лекарственной устойчивости барьерный механизм играет главную и основную роль. Учитывая полученные результаты исследования, авторы предлагают ввести в специальную литературу два понятия: апоптозпротекторы и апоптозкорректирующую терапию.

**Ключевые слова:** лекарственно-устойчивый туберкулез, первичная и вторичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза, интенсивная химиотерапия.

In 2009–2011 the structure and development of primary and acquired (secondary) drug resistance in mycobacterium tuberculosis (TB) are studied in 126 patients with pulmonary TB attended by bacterioexcretion. Intensive chemotherapy during 6 months appears to be effective in 77,8 % of patients. It is proved that the patients with primary drug resistance develop acquired (secondary) immunodeficiency when the number of  $CD_4^+$  and  $CD_8^+$  lymphocytes and neutrophil phagocytic activity are decreased. Acquired (secondary) immunodeficiency is due to

accelerated induced apoptosis. Barrier mechanism plays the main role in drug resistance development. The results of the investigation make it necessary to introduce two new terms in special literature: apoptosis protectors and apoptosis restoration therapy.

**Key words:** drug resistant tuberculosis, primary and acquired (secondary) drug resistance in mycobacterium tuberculosis, intensive chemotherapy.

Различают 3 механизма возникновения лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний:

- 1) барьерный механизм (разрушение мембран клеток макроорганизма и нарушение проницаемости клеточной стенки микроба);
- 2) инаktivация антимикробного препарата ферментами, например,  $\beta$ -лактамазой;
- 3) возникновение лекарственной устойчивости вследствие генных мутаций.

Из трёх указанных основным механизмом развития лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулёза (МБТ) являются мутации в генах возбудителя [5]. Развитие спонтанных мутаций устойчивости у МБТ сразу к нескольким препаратам практически невозможно, так как нет единого гена, кодирующего устойчивость сразу к нескольким противотуберкулёзным препаратам. Вероятность развития устойчивости МБТ обратно пропорциональна эффективности противотуберкулёзных препаратов (ППП). Чем эффективнее ППП, тем меньше и медленнее возникает к нему ЛУ [6].

В клинике туберкулёза применяется классификация на *первичную и вторичную ЛУ*. Именно эти две разновидности ЛУ МБТ определяют тактику и стратегию химиотерапии больного туберкулёзом.

Установлено, что лекарственная устойчивость МБТ возникает внутри каверны и в фокусах казеоза. Мы предполагаем, что ЛУ, кроме каверны и фокуса казеоза, возникает внутриклеточно, внутри фагоцита [3]. Это мнение имеет научное обоснование, потому что туберкулез относится к так называемым внутриклеточным инфекциям (туберкулез, сибирская язва, болезнь Лайма, токсоплазмоз и др.). При внутриклеточной инфекции возбудитель заболевания длительно персистирует внутри фагоцита в активном и/или инертном состоянии.

*Цель настоящей работы:* изучить барьерный механизм возникновения лекарственной устойчивости МБТ в интенсивную фазу химиотерапии у впервые выявленных больных инфильтративным туберкулезом легких с первичной лекарственной устойчивостью.

## Материалы и методы

Применялась комплексная диагностика туберкулеза с одновременным многопрофильным исследованием барьерного механизма возникновения ЛУ с использованием клинко-рентгенологических, микробиологических, биохимических, иммунологических и специальных методик. При определении

первичной лекарственной устойчивости МБТ использовали критерии Всемирной организации здравоохранения. К первичной лекарственной устойчивости МБТ относились случаи, когда больной до микробиологического исследования не принимал ПТП или получал специфическую химиотерапию не более трёх недель. В клиническую разработку не вошли больные с казеозной пневмонией и хроническими заболеваниями органов дыхания, а также больные сахарным диабетом, острым и хроническим гепатитом, хроническим алкоголизмом.

В 2009–2011 гг. у 126 больных с впервые выявленным ограниченным (с поражением 1–2 сегментов легких) инфильтративным туберкулёзом лёгких с бактериовыделением изучена структура и динамика первичной (ПЛУ) и вторичной лекарственной устойчивости (ВЛУ) в интенсивную фазу химиотерапии. Мужчин было 84 человека (66,7%), женщин — 42 (33,3%). Все больные лечились в стационаре Кировского областного противотуберкулезного диспансера. Лекарственная устойчивость исследовалась до начала лечения, через 2, 4 и 6 месяцев *интенсивной химиотерапии* с применением 4–5 противотуберкулезных препаратов. Лекарственная устойчивость определялась методом абсолютных концентраций.

У 18 больных с ПЛУ в Кировском НИИ гематологии и переливания крови с использованием стандартных методов проведено комплексное исследование клеточного иммунитета по 11 показателям. Изучали содержание в периферической крови общего числа лейкоцитов, лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, субпопуляций Т-лимфоцитов ( $CD_4^+$ ;  $CD_8^+$  и  $CD_{95}^+$ -лимфоцитов), иммунодифференцировочный индекс, фагоцитарную активность нейтрофилов, фагоцитарный индекс (ФАН), уровень циркулирующих иммунных комплексов. У 18 больных определялось количество  $CD_{95}^+$ -лимфоцитов лимфоцитотоксическим тестом в динамике (метод Terasaki P.). Группой сравнения были соответствующие показатели здоровых лиц. Для статистической обработки полученных данных использовали программы «Biostat» и «Microsoft Excel» для «Windows XP». Достоверность различий между средними показателями оценивалась по критерию Стьюдента (t) с доверительной вероятностью  $p = 95\%$ .

Все обследованные больные до получения результата на ПЛУ лечились в стационаре областного противотуберкулёзного диспансера по I режиму химиотерапии. После получения результата о наличии лекарственной устойчивости МБТ к ПТП назначался IV индивидуальный режим химиотерапии с дополнительным применением 1–3 препаратов резервного ряда: максаквин, таривид, офлоксацин, рифабутин, протионамид, парааминосалициловая кислота, капреомицин, канамицин и циклосерин.

## Результаты

Из 126 впервые выявленных больных инфильтративным туберкулёзом лёгких ПЛУ определялась у 18 человек (14,3%). Структура ПЛУ оказалась следующей: к изониазиду 82,3%, рифампицину 45,1%, этамбутолу 13,1%, стрептомицину 97,5%. К пиразинамиду ЛУ не исследовали. Через 2 месяца индивидуальной интенсивной химиотерапии из 18 бактериовыделителей осталось 8, вторичная лекарственная устойчивость не определялась. Через 4 месяца из 18 больных с ПЛУ бактериовыделение осталось у 6, из них у 1 определялась вторичная ЛУ к протионамиду. Через 6 месяцев интенсивной химиотерапии бактериовыделение сохранилось у 4 больных, вторичная ЛУ определялась у всех 4-х больных к протионамиду, канамицину, капреомицину.

У больных с впервые выявленным туберкулёзом лёгких с первичной лекарственной устойчивостью интенсивная химиотерапия в течение 6 месяцев оказалась эффективной у 14 из 18 больных (77,8%), а неэффективной у 4 человек из 18 (22,2%).

Таким образом, через 6 месяцев из 18 больных с ПЛУ вторичная ЛУ возникла у 4 больных (22,2%). Из 108 больных с *лекарственночувствительным туберкулёзом* вторичная ЛУ через 2, 4 месяца лечения не определялась, через 6 месяцев возникла только у одного больного к протионамиду.

Методом индуцированной хемилюминисценции доказано, что в интенсивную фазу химиотерапии у больных с ПЛУ достоверно увеличивается активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по сравнению со здоровыми [4].

В настоящее время повышенная активность ПОЛ рассматривается как универсальный фактор повреждения клеточной мембраны и гибели клеток организма [1]. При длительной повышенной активности ПОЛ метаболизм клеток нарушается, уменьшается энергетика клетки до состояния энергетического голода и шока. Это и есть ускоренный апоптоз клеток макроорганизма на фоне интенсивной химиотерапии. Фагоцитоз не завершается, и возбудитель продолжает длительно персистировать внутри фагоцита [3, 6].

Чтобы подтвердить наличие ускоренного апоптоза в интенсивную фазу химиотерапии, мы исследовали количество  $CD_{95}^{+}$ -лимфоцитов в динамике. В настоящее время этот показатель рассматривается как активатор апоптоза [2]. У больных до начала интенсивной химиотерапии уровень  $CD_{95}^{+}$ -лимфоцитов составил  $19,5 \pm 2,56\%$ , а через 6 месяцев увеличился до  $34,5 \pm 0,65\%$  ( $p < 0,001$ ). Это убеждает, что у обследованных больных в интенсивную фазу химиотерапии туберкулёза ускоряется апоптоз.

В условиях ускоренного апоптоза развивается вторичный иммунодефицит. Вторичный иммунодефицит подтверждается исследованием иммунного статуса. При исследовании иммунного статуса оказалось, что у всех больных с ПЛУ через 6 месяцев интенсивной химиотерапии достоверно уменьшается количество  $CD_4^{+}$ -лимфоцитов с 0,7 до  $0,4 \times 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,001$ ),

CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-лимфоцитов с 0,45 до 0,24×10<sup>9</sup>/л (p < 0,001) и ФАН с 75,0±1,6% до 58,7±3,2% (p < 0,005). Увеличение количества CD<sub>95</sub><sup>+</sup>-лимфоцитов в интенсивную фазу химиотерапии и развитие вторичного иммунодефицита мы объясняем ускоренным апоптозом, индуцированным повышенной активностью ПОЛ.

Повышенная активность ПОЛ у обследованных больных индуцирует ускоренный апоптоз, а ускоренный апоптоз вызывает вторичный иммунодефицит. Наряду с этим у обследованных больных повышенная активность ПОЛ достоверно уменьшает функциональную активность фагоцитов. Полученные результаты многопрофильного исследования лекарственной устойчивости МБТ в интенсивную фазу химиотерапии позволяют предположить, что при повышенной активности ПОЛ нарушается мембрана фагоцита, противотуберкулёзные препараты проникают внутрь фагоцита и микроба, и вторичная ЛУ в интенсивную фазу химиотерапии возникает внутриклеточно, внутри фагоцита. Следовательно, барьерный механизм в возникновении вторичной ЛУ у больных с первичной ЛУ играет главную и основную роль.

Все больные с ПЛУ получали антиоксидантную терапию (тиосульфат натрия, аскорбиновая кислота, витамин Е, аевит, витерон и препараты янтарной кислоты), а также иммуномодуляторы (Т-активин, тималин, полиоксидоний). Тем не менее назначение антиоксидантной и иммунокорректирующей терапии не приводило к уменьшению активности ПОЛ и улучшению показателей вторичного иммунодефицита [4]. По нашему мнению, в интенсивную фазу химиотерапии целесообразно назначать протекторы клеточной мембраны и препараты, повышающие метаболизм и жизнеспособность клеток макроорганизма. Принимая это во внимание, в специальную литературу и практику лечения больных туберкулёзом следует ввести два новых понятия: апоптозпротекторы и апоптозкорректирующая терапия. Апоптозпротекторы и апоптозкорректирующая терапия должны рассматриваться как самостоятельный раздел патогенетического лечения больных туберкулёзом. Для подтверждения предполагаемой гипотезы необходимо провести дополнительные целенаправленные исследования.

### **Выводы**

1. У больных с впервые выявленным ограниченным инфильтративным туберкулёзом лёгких первичная лекарственная устойчивость определялась у 14,3%. После 6 месяцев интенсивной химиотерапии бактериовыделение прекратилось у 77,8% больных;
2. При интенсивной химиотерапии впервые выявленных больных инфильтративным туберкулезом легких с первичной лекарственной устойчивостью повышается активность перекисного окисления липидов, ускоряется апоптоз, достоверно уменьшается количество CD<sub>4</sub><sup>+</sup>,

- CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-лимфоцитов, снижается фагоцитарная активность нейтрофилов, повреждается клеточная мембрана и противотуберкулезные препараты проникают внутрь клетки. И, как следствие, создаются условия для возникновения лекарственной устойчивости внутриклеточно, внутри фагоцита;
3. В сравнении с лекарственночувствительным туберкулезом у больных с первичной лекарственной устойчивостью, вторичная лекарственная устойчивость возникает в более короткие сроки лечения и одновременно к двум и более противотуберкулезным препаратам. В возникновении вторичной лекарственной устойчивости у этих больных барьерный механизм играет главную и основную роль;
  4. Целесообразно использовать в специальной литературе и практике лечения больных туберкулёзом два понятия: апоптозпротекторы и апоптозкорректирующая терапия. Апоптозпротекторы и апоптозкорректирующую терапию следует рассматривать как самостоятельный раздел патогенетического лечения туберкулеза.

### Список литературы

- 1.Владимиров Ю.А. Физико-химические основы патологии клетки // Курс лекций в электронной версии. e-mail: [yuvlad@mail.ru](mailto:yuvlad@mail.ru) М. 2002.
- 2.Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В. Клиническая иммунология. Учебник для вузов. М.: ГЭОТАР Медиа, 2008. 432 с.
- 3.Зиновьев И.П. При стандартной химиотерапии больных туберкулёзом лекарственная устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* возникает внутри фагоцита // Тезисы докладов XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». М. 2005. 121 с.
- 4.Коковихина И.А. Активность перекисного окисления липидов у впервые выявленных больных лекарственно-устойчивым туберкулёзом лёгких // Тезисы докладов Всероссийской конференции студентов и молодых учёных, посвящённая всемирному дню борьбы с туберкулёзом «Актуальные вопросы фтизиатрии, пульмонологии и торакальной хирургии». М. 2006. 53 с.
- 5.Мишин В.Ю. Лекарственно-устойчивый туберкулёз лёгких. Учебное пособие для врачей. М.: ГОУ ВПО МГМСУ, 2005. 142 с.
- 6.Рекомендации по лечению резистентных форм туберкулёза // Всемирная организация здравоохранения. 1998 г.

### Сведения об авторах

*Зиновьев Илларион Павлович* — д.м.н., профессор кафедры фтизиатрии Кировской ГМА. Раб. телефон: 8 (8332) 62-26-26. Факс: 8 (8332) 62-28-01.  
E-mail: [tbc@kirovgma.ru](mailto:tbc@kirovgma.ru);

*Поздеева Наталья Владимировна* — к.м.н., ассистент кафедры фтизиатрии Кировской ГМА. Раб. телефон: 8 (8332) 62-26-26.  
Факс: 8 (8332) 62-28-01. E-mail: [tbc@kirovgma.ru](mailto:tbc@kirovgma.ru); [nvp09@yandex.ru](mailto:nvp09@yandex.ru);

*Беляева Екатерина Леонидовна* — врач-интерн кафедры фтизиатрии Кировской ГМА. E-mail: [tbc@kirovgma.ru](mailto:tbc@kirovgma.ru); [belyaevakatenal@rambler.ru](mailto:belyaevakatenal@rambler.ru);

*Эсаулова Надежда Ардалионовна* — заведующая бактериологической лабораторией Кировского областного клинического противотуберкулезного диспансера. Факс: 8 (8332) 62-28-01;

*Новиков Вячеслав Геннадьевич* — главный врач Кировского областного клинического противотуберкулезного диспансера. Факс: 8 (8332) 62-28-01.