

ставляются весьма ограниченными. В этой ситуации существенное значение приобретает изучение ряда биохимических показателей (малоновый диальдегид, серотонин и гистамин), позволяющих уточнить показания к хирургическому вмешательству и определить рациональные сроки для его проведения. У ряда больных инфильтративным туберкулезом использование хирургического вмешательства на ранних этапах лечения является методом, альтернативным длительной и непрерывной химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева М.П. и др. Способ определения показаний к хирургическому лечению больных инфильтративным туберкулезом легких: А.с. 1668947 СССР.
2. Перельман М.И., Приймак А.А., Демидов Б.С. и др. // Пробл. туб.— 1987.— № 5.— С.3—5.
3. Перельман М.И., Кравцова И.В. // Там же.— 1989.— № 11.— С.19—22.
4. Раннее применение хирургических вмешательств у впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких: Метод. рекомендации / Репин Ю.М. и др.— М., 1982.
5. Стрельцов В.П. // Пробл. туб.— 1987.— № 2.— С.3—5.

Поступила 14.02.96.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК [615.281:579.873.21]—015.2

Г.Н.Можокина, Н.С.Смирнова, Т.Н.Левченко

ВЛИЯНИЕ МАКСАКВИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Российский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии МЗ РФ, Москва

INFLUENCE OF MAXAQUIN (LOMEFLOXACIN) ON ULTRASTRUCTURE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

G.N.Mozhokina, N.S.Smirnova, T.N.Levchenko

Summary

The influence of Maxaquin (Lomefloxacin) on the structure of mycobacterium tuberculosis strain H37Rv was studied *in vitro*. At 0.5 mkg/ml concentration of maxaquin during 24 hours the disorders in lipid capsule covering the microorganisms and in intercellular cooperation were marked. At 10 mkg/ml concentration of maxaquin there were profound destructive alterations in colony architecture and cell ultrastructure. Under maxaquin influence there were destruction of cell membrane, desorganisation of cytoplasm and organoids of mycobacteriums and lost of their viability.

Резюме

In vitro изучено влияние максаквина в широком диапазоне терапевтических концентраций на анатомию микобактерий туберкулеза лабораторного штамма H37Rv. При воздействии максаквина в концентрации 0,5 мкг/мл в течение суток наблюдалось разрушение липидного капсульного покрова колоний и нарушение взаимодействия клеток. С увеличением концентрации препарата до 10 мкг/мл отмечались изменения в архитектонике колоний и ультраструктуре клеток. Под влиянием максаквина происходило разрушение цитоплазматической мембраны, дезорганизация цитоплазмы и органоидов микобактерий с потерей ими жизнеспособности.

Максаквин (лемефлоксацина гидрохлорид) — дифторированный препарат хинолонового ряда, обладающий активностью *in vitro* в отношении микобактерий туберкулеза [3,5]. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) максаквина колеблется в диапазоне 0,5—4,0 мкг/мл. Первый клинический опыт применения максаквина для лечения больных туберкулезом легких показал преимущества схем комплексной терапии с включением этого препарата, особенно в случаях лекарственной устойчивости возбудителя к основным противотуберкулезным средствам [4]. В связи с этим

представляет большой интерес изучение тонких механизмов действия максаквина на микобактерии. В литературе практически отсутствуют данные по морфологическим изменениям в клетках микобактерий туберкулеза под влиянием фторхинолонов и максаквина, в частности, большинство работ *in vitro* касаются только определения величины МПК и МБК.

Для выяснения механизма действия максаквина на микобактерии туберкулеза нами были использованы методы электронной микроскопии. Культуру микобактерий туберкулеза штамма H37Rv для этих исследо-

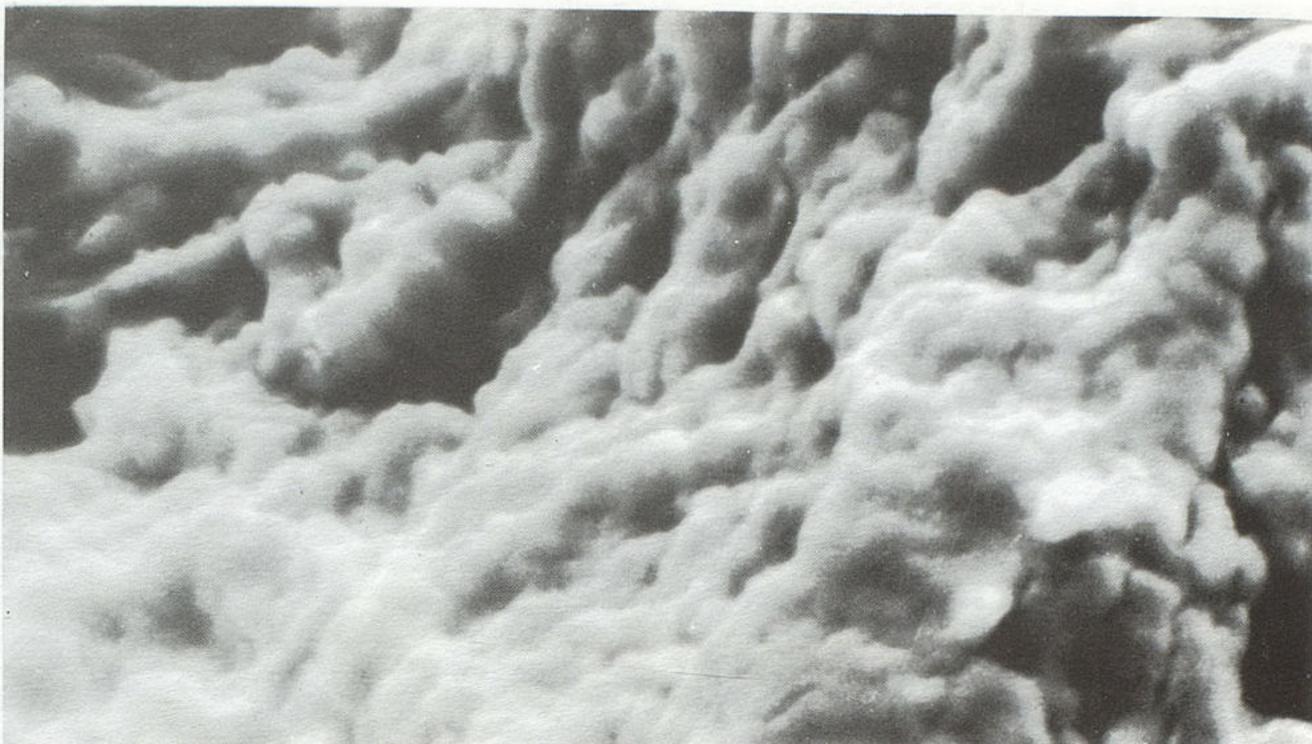


Рис. 1. Липидный капсульный покров на поверхности колоний микобактерий туберкулеза H37Rv. Контрольная культура (без воздействия препарата). Ув. $\times 20\ 000$.

ваний выращивали на плотной питательной среде Левенштейна—Йенсена на миллипоровом фильтре в течение 2 нед. Для изучения влияния препарата на архитектуру колоний микобактерии подвергали 24-

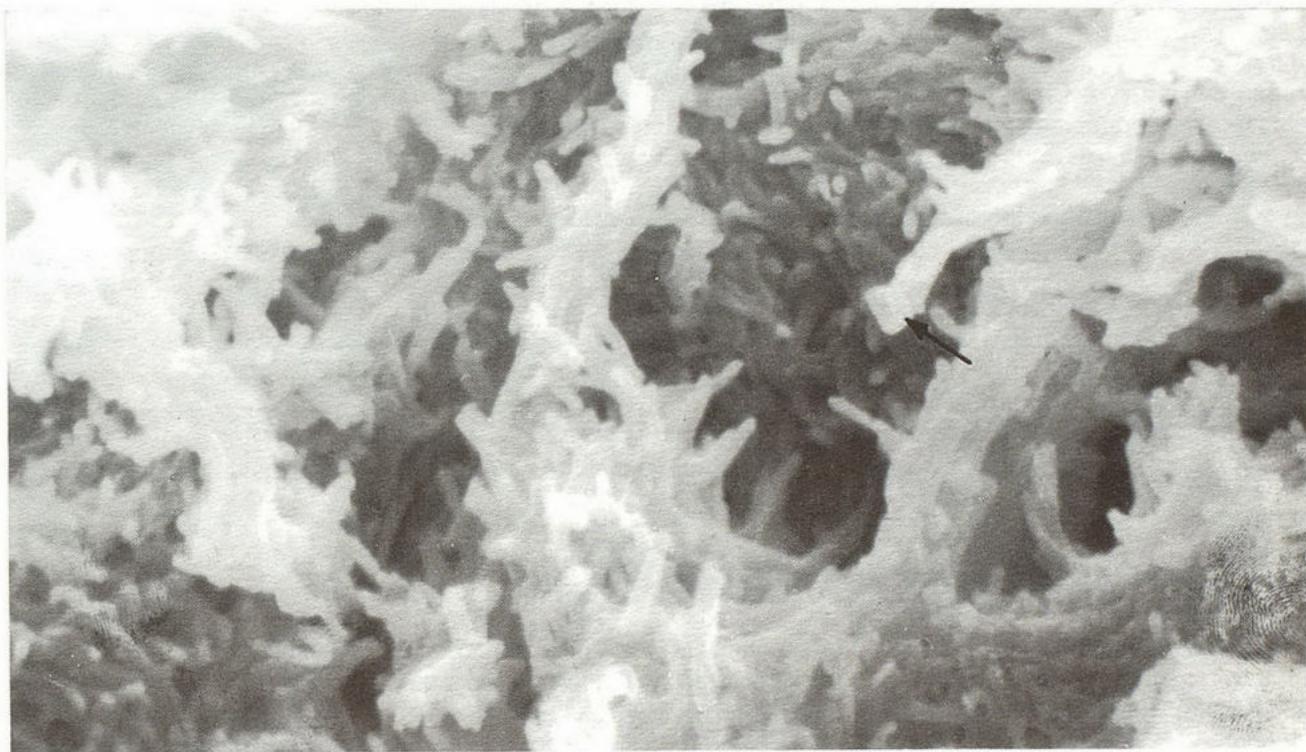


Рис. 2. Культура микобактерий туберкулеза после воздействия максаквина в концентрации 0,5 мкг/мл в течение 24 ч. Отсутствие липидного капсульного покрова, нарушение взаимодействия клеток и появление клеток с измененной структурой. Ув. $\times 15\ 000$.



Рис.3. Культура микобактерий туберкулеза после воздействия максаквина в концентрации 1,0 мкг/мл в течение 24 ч. Деструкция части клеток с образованием "оплавленных" тяжей и мелкоглобулярных структур. Ув. $\times 15\ 000$.

часовому воздействию концентрации 0,5, 1, 2, 5, 10 мкг/мл при 37°C. Затем бактериальный осадок фиксировали в смеси формальдегида, глутарового альдегида и пикриновой кислоты на какодилатном буфере (pH 7,2—7,4) в течение 1 ч при комнатной температуре и проводили дегидратацию в градиенте этанола и ацетона. Высушенный путем обхода критической точки материал напыляли серебром в ВУП-5 и просматривали в сканирующем электронном микроскопе BS 340 ("Tesla", Чехословакия). Для изучения ультраструктуры микобактериальных клеток культуру подвергали воздействию 10 мкг/мл максаквина в течение 24, 48 и 72 ч при температуре 37°C. Затем бактериальную массу фиксировали аналогичным образом с постфиксацией в водном 1% растворе четырехоксида осмия и дегидратацией в градиенте этанола и заливали в эпоксидную смолу аралдит М по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 (Швеция). Срезы контрастировали по стандартному методу *Reinolds* (1963) и просматривали в электронном микроскопе BS-500 ("Tesla") при ускоряющем напряжении 90 kV.

На сканограммах культуры микобактерий из контрольных проб (те же условия опыта, но без воздействия максаквина) отмечали наличие на поверхности микроколоний плотного липидного капсульного покрова, защищающего их от действия многих антибактериальных препаратов (рис. 1), под которым контурировались тесно упакованные клетки палочковидной формы. Ультратонкое строение микобактерий было аналогичным описанному *Т.Н.Левченко* [2].

При изучении в сканирующем электронном микроскопе колоний микобактерий при 24-часовом воздействии на них максаквина в концентрации 0,5 мкг/мл выявили почти полную деструкцию липидного капсульного покрова, что открывает доступ препарату непосредственно к бактериальным клеткам. При этом нарушались взаимосвязи клеток и появлялись в значительном количестве свободно лежащие особи (рис.2). Выявлялись единичные округлые клетки с ундулирующей поверхностью. Однако в микроколониях сохранялись клетки с нормальной структурой, а также особи в фазе деления.

Увеличение концентрации максаквина до 1,0 мкг/мл повлекло за собой дальнейшее усиление деструктивных изменений в колониях. Появились тяжи с "оплавленной" поверхностью, в которых сложно различить отдельные клетки. Очевидно, это обусловлено изменениями клеточной стенки микобактерий (рис.3). Увеличилось количество клеток в виде "барабанных палочек", укороченных и сферической формы. В тяжах выявлялись единичные образования, состоящие из мелких замкнутых структур, которые, вероятно, являются остатками мембран лизированных клеток (см. рис.3, указано стрелкой).

При действии препарата в концентрации 2,0 мкг/мл микроколонии как топографическая структура не определялись в большей своей массе. Выявлялись участки клеточной массы с общей "оплавленной" поверхностью, что, вероятно, обусловлено разрывами клеточной стенки и цитоплазматической мембраны и выходом содержимого в межклеточное пространство. Увеличилось

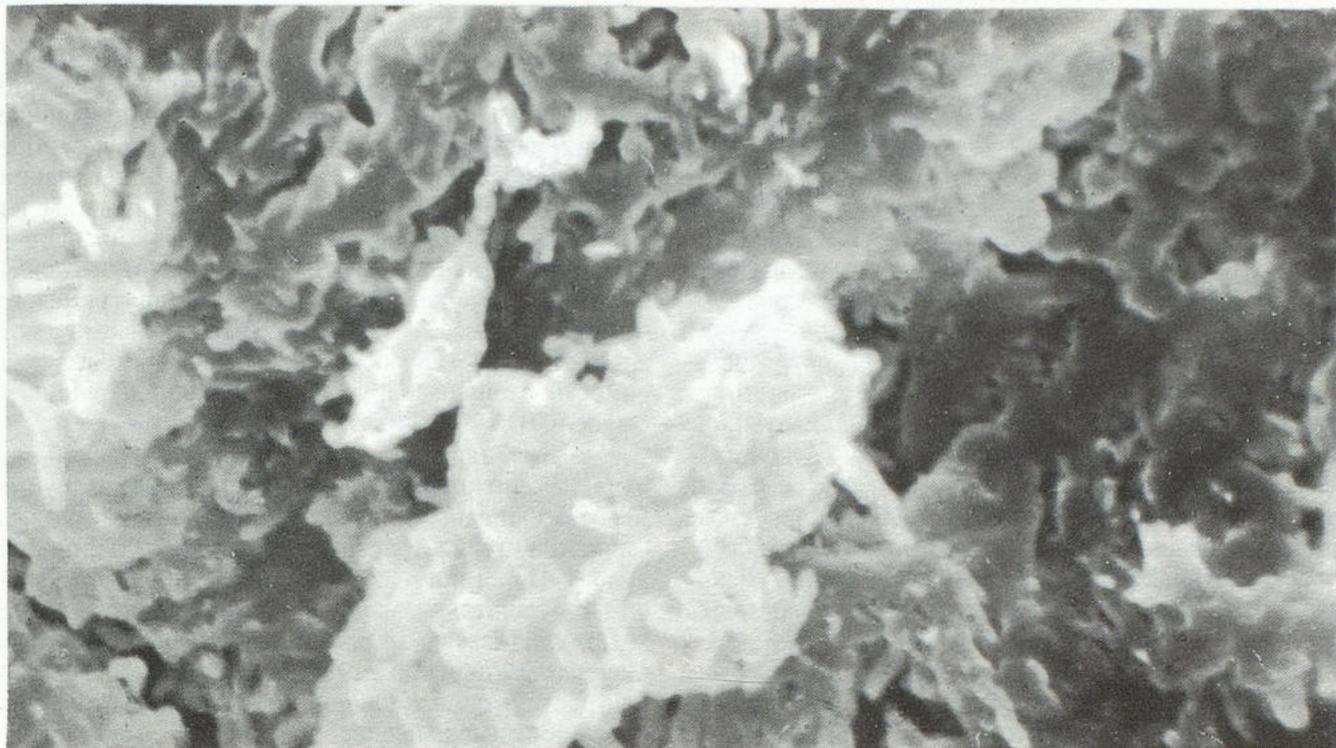


Рис.4. Культура микобактерий туберкулеза после воздействия максаквина в концентрации 5,0 мкг/мл в течение 24 ч. Полная деструкция практически всех клеточных элементов колоний микобактерий. Ув. $\times 15\ 000$.

количество укороченных округлых отдельно лежащих клеток.

При увеличении концентрации максаквина до 5,0 мкг/мл наблюдалось расширение площади участков

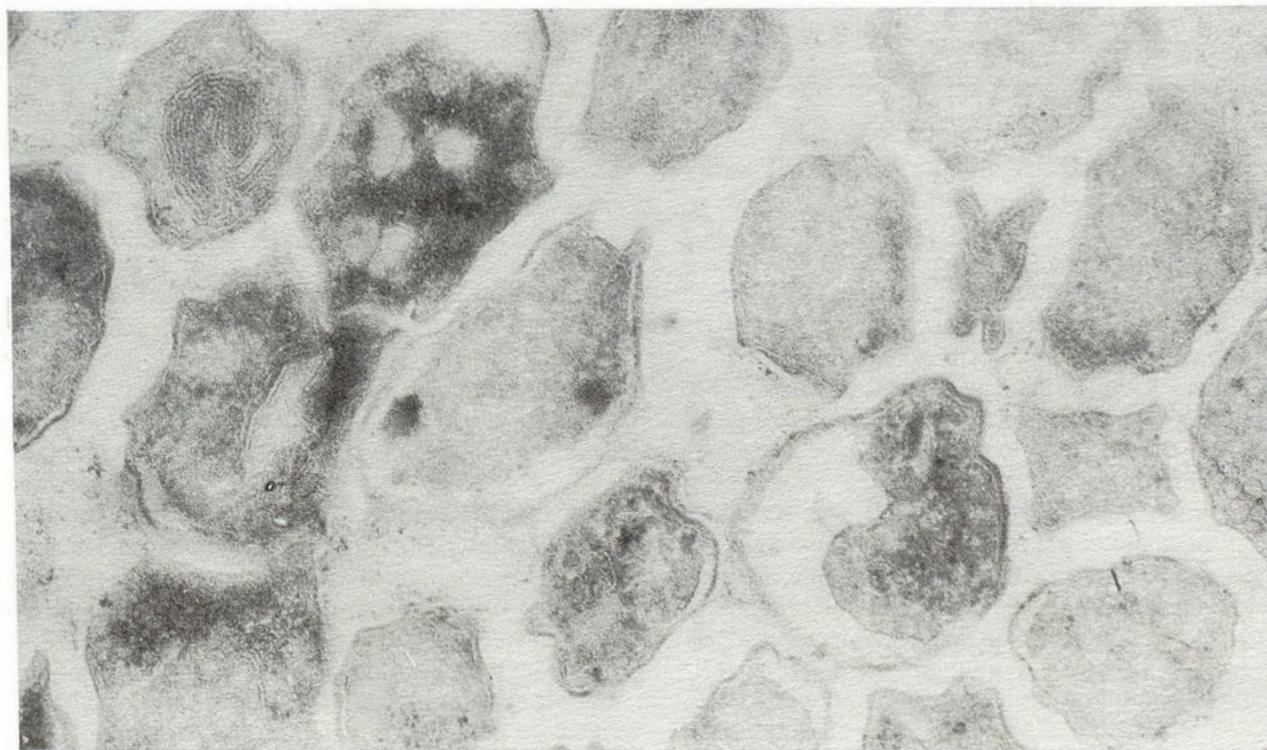


Рис.5. Деструктивные изменения в ультраструктуре клеток микобактерий туберкулеза после воздействия максаквина в концентрации 10,0 мкг/мл в течение 24 ч. Ув. $\times 65\ 000$.

с "оплавленной" бесструктурной поверхностью. Однако еще встречались единичные микроколонии, которые частично сохраняли свою топографию и состояли из палочковидных клеток (рис.4).

При воздействии препарата в концентрации 10 мкг/мл на микобактерии отмечали дальнейшее прогрессирование деструктивных изменений в архитектонике колоний: липидный капсульный покров практически отсутствовал, тяжи были бесструктурны.

На ультратонких срезах у большинства микобактерий, подвергшихся 24-часовому воздействию 10 мкг/мл максаквина, выявлены глубокие изменения ультраструктуры. Клеточная стенка отслаивалась от цитоплазматической мембраны и теряла свою ультраструктурную организацию. В участках отслоения клеточной стенки отмечалось разрыхление и фрагментация цитоплазматической мембраны, что сопровождалось выходом части цитоплазмы в полости — карманы, образуемые в местах отслоения клеточной стенки. Изменялась ультраструктурная характеристика цитоплазмы: уменьшалась ее плотность, появлялись участки разрыхления и вакуолизации. У некоторых бактерий наблюдалась неравномерная конденсация цитоплазмы, наличие тонкостенных везикул с наполнением, которые, вероятно, являются продуктом деструкции внутрицитоплазматических мембран (мезосом). В некоторых клетках наблюдалось закручивание мезосом, которые принимали вид миелиноподобных структур, заполняющих почти весь объем цитоплазмы (рис.5).

После 48-часового воздействия этой концентрации препарата на микобактерии наблюдали и отслоение, и разрушение клеточной стенки, деструкцию плазмолеммы и цитоплазмы, фрагменты которой встречались между останками клеток, то есть микобактерии утрачивали свою ультраструктурную организацию.

Воздействие максаквина в течение 72 ч приводило к полному разрушению клеток микобактерий, которые

представляли собой массу клеточных фрагментов, не подлежащих идентификации.

Таким образом, максаквин уже в концентрации 0,5 мкг/мл вызывает существенные разрушения липидного капсульного покрова, а с увеличением концентрации и деструкцию топографической структуры микроколоний. Воздействие препарата в концентрации 10 мкг/мл в течение 24 ч приводит к глубоким изменениям ультраструктуры: отслоению и разрушению клеточной стенки, деструкции цитоплазматической мембраны, дезорганизации цитоплазмы и внутрицитоплазматических мембран. Данные изменения приводят к потере клетками жизнеспособности. Отмечена прямая зависимость степени нарушения от концентрации максаквина.

Сходные нарушения в цитоплазматической мембране, изменения структуры цитоплазмы и разрушение мезосом описаны в литературе при воздействии рифампицина на ультраструктуру микобактерий туберкулеза [1]. Таким образом, в механизме бактерицидного действия максаквина на микобактерии туберкулеза существенное значение имеет процесс деструкции цитоплазматической мембраны и развитие глубоких ультраструктурных изменений в клетке, что приводит к потере ими жизнеспособности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулевская С.А., Милованова Е.В. // Пробл. туб.— 1977.— № 5.— С.67—73.
2. Левченко Т.Н. Анатомия микобактерий туберкулеза в норме и в условиях применения новых методов патогенетической терапии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1992.
3. Падейская Е.Н. // Пульмонология.— 1993.— Приложение.— С.71—73.
4. Соколова Г.Б., Корякин В.А., Куничан А.Д. и др. // Клин. фармакол. и тер.— 1995.— Т.4, № 1.— С.31—35.
5. Piersimoni C. et al. // Am. Rev. Respir. Dis.— 1992.— Vol.146, № 6.— P.1145—1147.