

И. П. АШМАРИН, Г. И. ВАВИЛИН, Б. И. ВИШНЕВСКИЙ,
И. Э. ГАБЕР, А. Е. ПЕРЕЛЬМАН, А. Ш. САМЕДОВ

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИСТОНОВ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ *IN VITRO* И *IN VIVO* — ПОТЕНЦИРОВАНИЕ ЭФФЕКТА ТУБАЗИДА

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 1 II 1971)

Основные белки клеточного ядра — гистоны в концентрациях порядка 10—100 мкг/мл подавляют развитие многих патогенных бактерий и ДНК-содержащих вирусов и, в определенных условиях, стимулируют некоторые этапы фагоцитоза (¹, ², ³, ⁷⁻⁹). Подобные гистонам белки лейкоцитов участвуют в подавлении фагоцитированных микроорганизмов (¹²). Гистоны характеризуются низкой токсичностью при различных методах введения животным (²), высокой способностью проникать через биологические мембраны (¹⁰) и незначительной антигенностью (¹¹). Они оказались также агентами, которые в малых концентрациях способны повышать проницаемость мембран для других соединений (¹⁰). Известен, наконец, обширный опыт изучения школой З. В. Ермольевой фармакологических свойств протаминов — основных белков спермиев, близких к гистонам по составу и локализации, но более простых по структуре (⁴). Все это делает понятным интерес к возможным фармакологическим аспектам применения гистонов. Отмеченное выше влияние гистонов на проницаемость мембран для других соединений и на реакции фагоцитоза побуждает также к попыткам сочетанного их применения с другими антибактериальными агентами, особенно в тех случаях, когда эффективность каждого из агентов порознь недостаточна. Задачей настоящего исследования являлось изучение возможности усиления гистонами туберкулостатического действия тубазида как *in vitro*, так и *in vivo*.

Изучение совместного действия *in vitro* различных фракций гистонов вилочковой железы теленка, полученных по методу Джонса (⁶), и тубазида проводилось методом серийных разведений в жидкой кровяной среде Прайса. В качестве тест-штамма использовали культуру микобактерий туберкулеза человеческого типа H₃₇R_v. К микробной суспензии (0,5·10⁹ микробных тел в 1 мл) добавляли равный объем среды Прайса и приготавливали мазки на узких стеклах, которые после высушивания и обработки 5% серной кислотой погружали в пробирки с жидкой кровяной средой, содержащей различные фракции гистонов (по 50 мкг/мл) и тубазида (от 0,5 до 0,002 мкг/мл) с двукратными интервалами между испытываемыми концентрациями. После 10-дневной инкубации окрашивали по Циль-Нильсену и просматривали под малым увеличением, отмечая минимальную концентрацию тубазида, задерживающую рост микроколоний. В избранных условиях опыта гистоны без тубазида не задерживали рост туберкулезных микроколоний. Минимальная концентрация тубазида, без гистонов, полностью подавлявшая рост, составила 0,060 мкг/мл. В присутствии же гистона f2a она снижалась в 4 раза (до 0,015 мкг/мл). Все остальные фракции таким действием не обладали. Сочетание фракций f2a и f3 в соотношении 1:1 снизило минимальную туберкулостатическую концентрацию тубазида до 0,030 мкг/мл, опять-таки, по-видимому, за счет фракции f2a. Неожиданным оказался совместный эффект фракций f1 и f2b (в соотношении 1:2). Несмотря на отсутствие усиливающего действия каждой фракции в отдельности, вместе они усиливали эффект тубазида в два раза.

Эти результаты, вместе с данными о низкой токсичности гистонов, побуждали нас испытать возможность усиления последними лечебного дей-

вия тубазида *in vivo*. Однако препятствием для таких экспериментов являлось то, что ранее были обстоятельно изучены лишь разовые переносимые дозы фракций гистонов⁽²⁾. Поэтому мы должны были предварительно установить максимальные переносимые и максимальные терапевтические дозы (д.т.м.) фракций при длительном повторном введении белым мышам и морским свинкам.

Для белых мышей весом от 12 до 21 г были испытаны три режима внутрибрюшинного введения 0,1—0,5% растворов гистонов в 0,85% NaCl: 1) в течение 11 дней с интервалом 48 час., 2) в течение того же периода один раз в сутки, 3) в течение 30 дней один раз в сутки. Завершающие эксперименты проведены при введении каждой фракции 30—40 мышам. Наибольшими оказались д.т.м. фракции f 2a (200—220 мг/кг при первом режиме, 160 мг/кг — при втором и 50 мг/кг — при третьем). Соответствующие суммарные дозы составляли 1200—1320, 1760 и 1500 мг/кг. Д.т.м. остальных трех фракций были в 2—3 раза ниже.

После окончания курсов введения мы продолжали вести наблюдение за животными в течение 1,5 месяцев. Гибели в течение этого времени не наблюдалось. В поведении мышей не были заметны какие-либо отклонения при сравнении с контрольными животными. Только в течение 2—3 час. после введения гистонов наблюдалось заметное ограничение движений животных. Отставание в весе у подопытных животных по сравнению с контрольными не превышало 7—10%. Таким образом, эти данные позволяют квалифицировать представленные дозы именно как д.т.м. Следует, однако, отметить, что при наиболее продолжительном режиме введения при вскрытии мышей отмечались многочисленные спайки в брюшной полости — в области инъекций. Видимо, в будущем, особенно если иметь в виду попытки клинического применения гистонов, необходима дальнейшая отработка методов повторного парентерального введения. Для целей же изучения в эксперименте действия гистонов на туберкулостатическую активность тубазида такая оценка д.т.м. оказалась достаточной.

Д.т.м. фракций гистонов были также установлены для морских свинок (весом 250—300 г) при внутрибрюшинном введении 1 раз в сутки в течение пяти 5-дневных периодов, разделенных двухсуточными интервалами. Они оказались близкими к таковым для мышей.

Наконец, на примере фракции f2a была оценена способность гистона вызывать у морских свинок анафилактический шок. Предварительно была установлена DL_{50} при внутрисердечном введении (9 ± 3 мг/кг). Затем четыре морские свинки были сенсибилизированы подкожным введением 120 мг/кг гистона. При введении разрешающей дозы гистона по прошествии 12 дней после сенсибилизации не наблюдалось даже первичных симптомов анафилаксии. Это соответствует литературным данным о низкой антигенности гистонов⁽¹⁴⁾.

Все изложенное послужило основой для экспериментов по усилению гистонами лечебного действия тубазида *in vivo*.

Животные подвергались заражению лабораторным штаммом БК «ВОУ-109», белые мыши-внутривенно (в дозе 0,1 мг), морские свинки подкожно (в дозе 0,05 мг). Гистон и тубазид вводили ежедневно со дня заражения в течение пяти недель белым мышам и четырех недель — морским свинкам (с еженедельным перерывом на двое суток). В опытах на мышах использована фракция f2a, в опытах на свинках — комбинация фракций f1 и f2b (1:2). Однократная доза вводимого внутрибрюшинно гистона для обоих видов животных составляла 36 мг/кг. Общая доза на курс лечения мышей 900 мг/кг, свинок 756 мг/кг. Тубазид вводили под кожу в дозе 5 мг/кг мышам и в дозе 3 мг/кг — свинкам, что составляло около $\frac{1}{3}$ обычно применяемой в экспериментах терапевтической дозы химиопрепарата. Одну контрольную группу составляли зараженные туберкулезом белые мыши и морские свинки, которым вводили только один тубазид, другую — зараженные животные, оставленные без лечения. По окончании

эксперимента по 10 животных из каждой группы были забиты. Эффективность проведенной терапии оценивали по данным морфологического и бактериологического исследований органов животных с учетом их веса, установленного при вскрытии. Легкие, почеч, селезенку, а у морских свинок — и регионарные по отношению к месту заражения лимфатические узлы исследовали гистологически.

У мышей, получавших тубазид и гистон непосредственно после заражения, в легких определялись немногочисленные очаги туберкулезного воспаления, ткань легкого оставалась воздушной; у животных, леченных одним тубазидом, имело место обширное поражение легких сливными туберкулезными очагами. Вес легких у мышей подопытной группы (359 ± 30 мг) был меньшим, чем у контрольной (561 ± 47 мг) при надежности различия $P < 0,01$. У первых наблюдалась четкая задержка размножения микобактерий туберкулеза в органах. Индекс высеваемости (по интенсивности роста колоний в пробирках) из органов подопытных мышей был равен $1,3 \pm 0,32$, а контрольных $3,0 \pm 0,35$ ($P < 0,05$).

В опытах на морских свинках регионарный к месту заражения лимфатический узел у всех без исключения животных, получавших тубазид и гистон, был мелким, наибольший его диаметр достигал 0,58 см. Перифокальная реакция была минимальной. Очаги творожистого некроза в ткани лимфоузла, как правило, не определялись. В контрольной группе (введение одного тубазид) регионарный узел спаян с подлежащими тканями, крупный, наибольший диаметр его достигал $2,3 \pm 0,14$ см (надежность отличия от опыта $P < 0,01$). На разрезе были обнаружены крупные очаги творожистого некроза. Ткань узла заменена специфическими грануляциями с крупными скоплениями лейкоцитов и обширными очагами казеозного некроза.

Специфические изменения во внутренних органах у животных подопытной группы были минимальными. При гистологическом исследовании в печени ни в одном случае не удалось обнаружить очагов туберкулезной диссеминации; в селезенке лишь у 4 животных из 10 были отмечены единичные мелкие эпителиоидные бугорки.

У всех контрольных свинок, леченных одним тубазидом, специфические изменения в органах были отчетливо выражены. Вес селезенки у подопытных морских свинок составлял 912 ± 59 мг, у контрольных $1,180 \pm 97$ мг ($P < 0,05$). Индекс высеваемости из органов подопытных животных был значительно ниже, чем в контроле, и составлял $0,23 \pm 0,08$ и $0,57 \pm 0,14$ ($P < 0,05$) соответственно.

Таким образом, некоторые фракции гистонов вилочковой железы теленка (f2a, а также комбинация f1 и f2b) существенно усиливают действие тубазиды на микобактерии туберкулеза как *in vitro*, так и *in vivo*. Целесообразным поэтому представляется дальнейшее исследование сочетанного действия фракций гистонов и других антибактериальных агентов не только *in vitro*, но и при экспериментальных инфекциях животных.

Ленинградский государственный университет
им. А. А. Жданова

Поступило
8 I 1971

Научно-исследовательский институт туберкулеза
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. П. Ашмарин, Л. Б. Борисов, Ф. А. Шпигунов, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., № 6, 54 (1968). ² И. П. Ашмарин, Е. Л. Авенирова, К. Рорингер, Вопр. мед. хим., 16, № 5, 487 (1970). ³ А. Г. Букринская, А. Р. Гительман и др., Вопр. вирусол., № 6, 720 (1965). ⁴ З. В. Ермольева, Антибиотики, интерферон, бактериальные полисахариды, М., 1968. ⁵ В. М. Жданов, Л. А. Мельникова и др., ДАН, 165, № 5, 1182 (1965). ⁶ E. W. Johns, Biochem. J., 92, № 1, 55 (1964). ⁷ J. Guillaume, J. C. Dericux, G. Martin, Ann. Inst. Past., 103, № 1, 1 (1962). ⁸ J. G. Hirsch, J. Exp. Med., 108, № 5, 925 (1958). ⁹ M. Pelletier, A. Delaunay, Ann. Inst. Past., 111, № 4, 413 (1966). ¹⁰ H. J. P. Ryser, Sci., 159, № 3813, 390 (1968). ¹¹ A. L. Sandberg, M. Liss, B. D. Stollar, J. Immunol., 98, № 6, 1182 (1967). ¹² H. I. Zeya, J. K. Spitznagel, J. Exp. Med., 127, № 5, 927 (1968).