

## Репаративный остеогенез при включении ронколейкина в терапию экспериментального туберкулезного остита

Н.В. ЗАБОЛОТНЫХ, Т.И. ВИНОГРАДОВА, М.Л. ВИТОВСКАЯ, С.Н. ВАСИЛЬЕВА, А.С. КАФТЫРЕВ, Б.М. АРИЭЛЬ, Т.А. НОВИЦКАЯ

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

### Reparative osteogenesis after incorporation of roncoleukin into therapy for experimental tuberculous gonitis

N.V. ZABOLOTNYKH, T.I. VINOGRADOVA, M.L. VITOVSKAYA, S.N. VASILYEVA, A.S. KAFTYREV, B.M. ARIEL, T.A. NOVITSKAYA

Saint Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg

Оценивали репаративный остеогенез при включении ронколейкина в комплексную терапию экспериментального лекарственно-устойчивого туберкулезного остита. Ронколейкин (12,5 мкг/кг, 5 инъекций, 1 раз в 3 дня) применялся на фоне противотуберкулезного лечения до и после комбинированной пластики операционных дефектов (аутокость + OsteoSet-T). Показано, что ронколейкин при его использовании в послеоперационном периоде комбинированной костной пластики способствовал снижению распространенности очагов специфического воспаления в костной ткани, исчезновению альтернативно-некротического компонента, повышению интенсивности остеогенеза с новообразованием костных балок, а также активации процессов кроветворения в костном мозге. Параллельно интенсификации репаративных процессов в костной ткани выявлена стимуляция иммунокорректором поглотительной и переваривающей активности перитонеальных макрофагов, угнетенных при экспериментальном туберкулезном остите.

*Ключевые слова:* экспериментальный туберкулезный остит, ронколейкин, репаративный остеогенез.

The authors evaluated reparative osteogenesis after incorporation of roncoleukin into combination therapy for experimental drug-resistant tuberculous osteitis. Roncoleukin (12.5 µg/kg, 5 injections, once every 3 days) was used during antituberculosis therapy before and after combined plasty (autobone + OsteoSet-T) in repairing surgical defects. When used in the postoperative period of combined osteoplasty, roncoleukin was shown to contribute to a reduction in the spread of specific inflammatory foci in bone tissue, cessation of an alternative necrotic component, an increase in the rate of osteogenesis with newly formed bone trabeculae, and activation of hematopoietic processes in the bone marrow. In parallel with intensified bone reparative processes, there was immunomodifier-induced stimulation of the absorption and digestion of peritoneal macrophages suppressed in experimental tuberculous osteitis.

*Key words:* experimental tuberculous osteitis, roncoleukin, reparative osteogenesis.

Процессы репарации регулируются целым рядом систем организма, в том числе и иммунной, обеспечивающей сопряженность воспаления, регенерации и фиброза, которая реализуется благодаря взаимодействию макрофагов и фибробластов — ключевых клеток разрешения воспаления и осуществляется медиаторами межклеточного взаимодействия цитокинами Th1 и провоспалительными цитокинами [1–3]. Показана тесная взаимосвязь торпидного течения репаративных процессов со сниженной функциональной активностью иммунокомпетентных клеток [4, 5]. Патологическое течение процессов заживления, коррелирующее с незавершенностью фагоцитоза в альвеолярных макрофагах, характерно и для туберкулезной инфекции [6].

Для фармакологической регуляции репаративных процессов и восстановления структурной целостности тканей в последнее время как в травматологии, так и при

различной воспалительной патологии начинают применяться иммуномодулирующие препараты [7–10].

При костно-суставном туберкулезе, для которого наряду с угнетением иммунного ответа характерно торпидное течение процессов заживления, присоединение иммунокорректирующей терапии к комбинированному (хирургическому и этиотропному) лечению может существенно повлиять на восстановление структуры кости.

Целью настоящего исследования явилась оценка репаративного остеогенеза при введении генно-инженерного аналога интерлейкина 2 ронколейкина в комплексную терапию экспериментального туберкулезного остита.

### Материал и методы

Работа выполнена на 42 кроликах-самцах породы шиншилла, у 36 из которых (2–4-я группа) моделирова-

ли туберкулезный остит по оригинальной методике [11]. В дистальный эпиметафиз бедренной кости вводили  $1 \cdot 10^6$  клеток клинического изолята *M. tuberculosis* №5419 с устойчивостью к четырем противотуберкулезным препаратам: изониазиду (10 мкг/мл), рифампицину (40 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этионамиду (30 мкг/мл). Для обеспечения обезболивающего, миорелаксирующего и седативного эффекта животным вводили 2% раствор рометара (*Xylazine*) внутримышечно в объеме 1–1,5 мл. Противотуберкулезная терапия назначалась после рентгенологического определения туберкулезного очага вплоть до выведения животных из эксперимента (изониазид 25 мг/кг подкожно; амикацин 30 мг/кг внутримышечно; этамбутол 50 мг/кг и офлоксацин 20 мг/кг внутривенно). Через 1 мес полихимиотерапии проводились некрэктомиа туберкулезного очага и комбинированное замещение операционного дефекта кристаллическим сульфатом кальция в сочетании с 4% тобрамицином (*OsteoSet-T*) и аутокостным трансплантатом, заготовленным из ребра крыла подвздошной кости. Кроликам 3-й и 4-й групп вводили ронколейкин (12,5 мг/кг внутривенно 1 раз в 3 дня, 5 инъекций): либо за 1 мес до (3-я группа), либо сразу после комбинированной пластики (4-я группа). Эффект иммунокорректора оценивался через 1 и 6 мес после проведения пластики. Функциональная активность перитонеальных макрофагов (пМф) оценивалась в реакции фагоцитоза пМф в однослойной культуре ( $1 \cdot 10^6$  клеток) в отношении клеточной взвеси дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, опсонизированных сывороткой мышей с вычислением фагоцитарной активности пМф, фагоцитарного числа, показателя и индекса завершенности фагоцитоза. Для гистологического изучения участок кости фиксировали в 10% формалине, декальцинировали трилоном Б, заливали в целлоидин-парафин и окрашивали гематоксилином и эозином и азур II-эозином. Кроликов выводили из опыта с использованием летальных доз зоветила (100 мг/кг). Статистически данные обрабатывались с использованием непараметрического *U*-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни и Фишера.

## Результаты и обсуждение

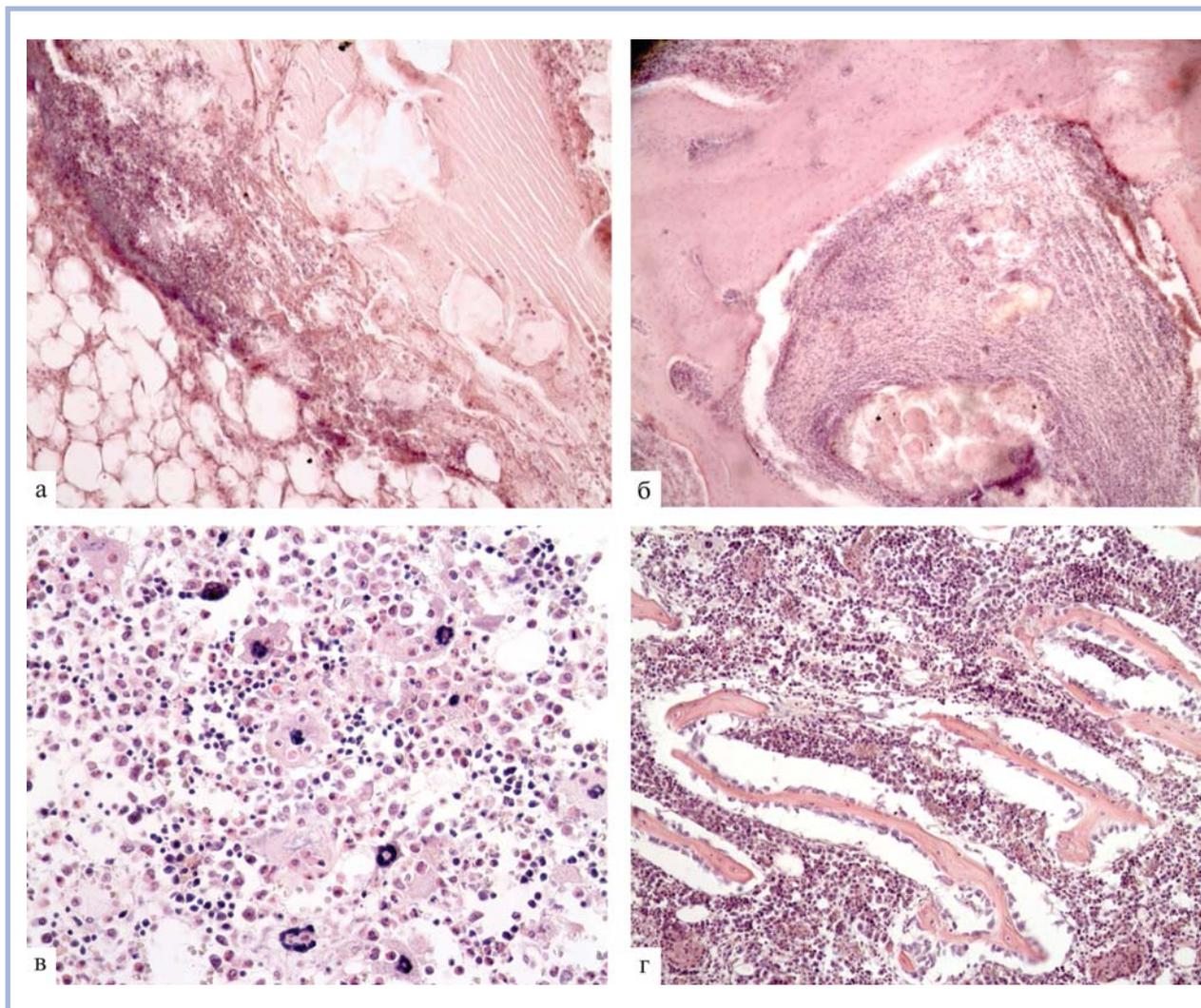
Исследование срезов костной ткани зоны пластики в дистальном отделе эпиметафиза бедренной кости через 1 мес после замещения дефекта во всех случаях показало его заполнение аутокостью и остеοидной тканью, содержащей небольшие округлые полости различного диаметра, по-видимому, на месте гранул декальцинированного материала *OsteoSet-T* (см. рисунок, а). У всех животных вблизи трансплантата обнаружены признаки активности специфического воспалительного процесса: небольшие эпителиοидно-клеточные гранулемы, крупные некротические очаги с ядерным детритом в центре (см. рисунок, б), участки с атрофичными костными балками, секвестрация, резорбция и некроз костных балок, а также дистрофические изменения хрящевой ткани. В то же время отмечены и признаки активного остеогенеза: увеличение количества остеобластов на поверхности костных балок, низко- и высокодифференцированная остеοидная ткань с множеством капилляров и рыхлыми фиброзными структурами, вновь образованные костные балки, участки гиперплазии костного мозга со скоплениями молодых кровяных клеток, а также мегакариоцитов.

Ронколейкин оказал наиболее отчетливое действие на процессы восстановления костной ткани при его использовании в послеоперационном периоде (4-я группа, см. рисунок, в, г). При лечении ронколейкином через 1 мес после пластики в 3 раза реже по сравнению с животными 2-й группы обнаруживался некроз костных балок (в 16,7% случаев против 50% в контроле пластики) и в 4 раза — дистрофия хряща (в 16,7% против 66,7%;  $p < 0,02$ ). Реже отмечался фиброз костного мозга (в 33,3% против 100% случаев в контроле пластики;  $p < 0,001$ ), хряща (50% против 66,7%) и остеοидной ткани (в 16,7% против 66,7%;  $p < 0,02$ ). Параллельно у кроликов 4-й группы зарегистрирована активация мегакариοцитарного ростка — его тотальная гиперплазия (в 50% против 0% случаев в контрольной группе;  $p < 0,01$ ), большое количество крупных мегакариοцитов (в 50% против 16,7%; см. рисунок, в), эмпириополез (в 50% против 0% случаев;  $p < 0,01$ ) и появление мегакариοцитарных кластеров (скопление мегакариοцитов в 33,3% против 0%;  $p < 0,05$ ). В 3 раза чаще, чем в контрольной группе (в 50% против 16,7% случаев), при назначении ронколейкина выявлялась и тенденция к мегалобластическому эритропоэзу.

Через 6 мес после операции во всех группах животных наблюдалось снижение распространенности специфического воспаления в костной ткани. У кроликов (4-я группа), леченных ронколейкином после комбинированной пластики, признаки активности инфекции определялись гораздо реже, чем в контроле пластики (2-я группа): очаги инфильтрации в 33,3% против 75% ( $p < 0,05$ ), некротизированные балки в 16,7% против 37,5%, дистрофия хряща в 66,7% против 75% случаев. Не обнаружено очагов некроза с ядерным детритом (0% против 37,5%;  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о снижении степени выраженности альтерации. Стимуляция процессов заживления под влиянием ронколейкина была более отчетливой. Чаще, чем в контрольной группе, выявлялись недифференцированная (в 100% против 12,5% в контроле пластики;  $p < 0,001$ ) и высокодифференцированная (в 50% против 12,5%;  $p < 0,05$ ) остеοидная ткань, а также новообразованные балки (в 100% против 62,5% случаев;  $p < 0,02$ ). В костном мозге чаще регистрировались признаки стимуляции эритроидного, мегакариοцитарного, а также миелоидного ростка.

У кроликов, получавших ронколейкин в дооперационный период, направленность признаков восстановления костной ткани имела тот же характер, что и при использовании препарата после операции, однако по их степени выраженности была несколько меньшей.

Определение иммунокорригирующего эффекта ронколейкина показало, что препарат отчетливо повысил угнетенные у кроликов с туберкулезным гонитом поглотительную и переваривающую активность пМф. Фагоцитарная активность Мф через 1 мес после комбинированной пластики (2 мес после заражения, табл. 1) у нелеченных ронколейкином животных с комбинированной пластикой операционного дефекта после некрэктомии туберкулезного очага (2-я группа) составляла в среднем 45,9% против 72,7% у интактных кроликов ( $p < 0,05$ ), фагоцитарное число — 4,9 дрожжевой клетки против 6 дрожжевых клеток ( $p < 0,05$ ), показатель завершенности фагоцитоза — 123,2 против 305,3 дрожжевой клетки ( $p < 0,01$ ). Ронколейкин в обеих схемах использования отчетливо повысил функциональную активность пМф до уровня интактной группы. При этом если у животных, получавших иммунокорректор до операции (3-я группа), по сравнению с кон-



**Гистологический срез. Костная ткань эпиметафиза бедренной кости кроликов, зараженных лекарственно-устойчивым штаммом *M. tuberculosis* №5419, через 1 мес после некрэктомии и комбинированной пластики без (а, б) и на фоне назначения ронколейкина (в, г).**

Окраска гематоксилином и эозином.

а — заполнение операционного дефекта в эпиметафизе бедренной кости аутокостью; полости различного диаметра, на месте гранул сульфат кальциевого материала OsteoSet-Г.  $\times 300$ ; б — крупный некротический очаг специфической инфильтрации.  $\times 300$ ; в — костный мозг кролика, получавшего ронколейкин в послеоперационном периоде; определяется большое количество лимфоцитов и крупных мегакариоцитов (некоторые с эмпериполезом).  $\times 600$ ; г — новообразованные костные балки с большим количеством остеобластов на их поверхности у кролика, получавшего ронколейкин в послеоперационном периоде.  $\times 300$ .

**Таблица 1. Показатели фагоцитоза у кроликов с экспериментальным лекарственно-устойчивым туберкулезным оститом через 1 мес после комбинированной пластики**

| Группа | Условия опыта   | Фагоцитарная активность, %          | Фагоцитарное число (количество дрожжевых клеток) | Показатель завершенности фагоцитоза (количество дрожжевых клеток) | Индекс завершенности фагоцитоза, усл. ед. |
|--------|---|-------------------------------------|--|---|---|
| 1-я    | Интактные ( $n=4$ )   | 72,7<br>(63—85)                     | 6,0<br>(5,06—7,47)                               | 305,3<br>(227—463)  | 3,05<br>(2,59—3,74)                       |
| 2-я    | Комбинированная пластика операционного дефекта ( $n=6$ )        | 45,9<br>(36—68)<br>$p_{1-2} < 0,05$ | 4,9<br>(3,76—6,38)<br>$p_{1-2} < 0,05$           | 123,2<br>(70—215)<br>$p_{1-2} < 0,01$                             | 2,61<br>(2,35—3,21)                       |
| 3-я    | Комбинированная пластика + ронколейкин до операции ( $n=6$ )    | 62,0<br>(51—81)<br>$p_{2-3} < 0,05$ | 5,23<br>(4,63—5,86)                              | 207,8<br>(161—276)  | 2,6<br>(1,62—2,95)                        |
| 4-я    | Комбинированная пластика + ронколейкин после операции ( $n=6$ ) | 65,3<br>(59—83)<br>$p_{2-4} < 0,05$ | 6,5<br>(5,8—7,3)<br>$p_{2-4} < 0,05$             | 327,0<br>(232—367)<br>$p_{2-4} < 0,05$                            | 3,5<br>(2,42—4,08)                        |

**Таблица 2.** Показатели фагоцитоза у кроликов с экспериментальным лекарственно-устойчивым туберкулезным оститом через 6 мес после комбинированной пластики

| Группа | Условия опыта   | Фагоцитарная активность, %        | Фагоцитарное число (количество дрожжевых клеток) | Показатель завершенности фагоцитоза (количество дрожжевых клеток) | Индекс завершенности фагоцитоза, усл. ед. |
|--------|---|-----------------------------------|--|---|---|
| 1-я    | Интактные ( $n=4$ )   | 70,0<br>(64–88)                   | 5,51<br>(4,82–6,8)                               | 266,0<br>(238–354)  | 3,74<br>(2,63–4,27)                       |
| 2-я    | Комбинированная пластика операционного дефекта ( $n=6$ )        | 48,0<br>(34–62)<br>$p_{1-2}<0,05$ | 4,4<br>(3,52–5,27)<br>$p_{1-2}<0,05$             | 143,5<br>(112–272)<br>$p_{1-2}<0,05$                              | 3,05<br>(2,16–4,01)                       |
| 3-я    | Комбинированная пластика + ронколейкин до операции ( $n=6$ )    | 52,3<br>(46–68)                   | 5,92<br>(4,33–6,51)<br>$p_{2-3}<0,05$            | 235,0<br>(169–309)  | 3,17<br>(2,47–4,29)                       |
| 4-я    | Комбинированная пластика + ронколейкин после операции ( $n=6$ ) | 58,4<br>(42–78)<br>$p_{2-4}<0,05$ | 5,68<br>(4,47–7,54)<br>$p_{2-4}<0,05$            | 276,2<br>(215–329)<br>$p_{2-4}<0,05$                              | 4,5<br>(2,26–5,93)                        |

тролем пластики значимо более высокой была только фагоцитарная активность пМф (62,0% против 45,9% в контроле пластики;  $p<0,05$ ), то введение ронколейкина в послеоперационном периоде (4-я группа) привело к достоверной стимуляции всех трех ингибированных показателей.

Через 6 мес после оперативного вмешательства (табл. 2) на фоне сохраняющейся ингибиции фагоцитоза у животных, не получавших иммунокорректор (2-я группа), у кроликов леченных ронколейкином, показатели фагоцитоза по-прежнему оставались на уровне интактной группы. При этом, как и на первом сроке наблюдения, более эффективной оказалась послеоперационная схема использования ронколейкина (4-я группа). При ее применении вновь по всем трем показателям отмечен достоверно более высокий, чем в нелеченном иммунокорректором контроле, уровень поглотительной и переваривающей активности пМф. Так, фагоцитарная активность составила в среднем 58,4% против 48% в контроле пластики ( $p<0,05$ ), фагоцитарное число — 5,7 против 4,4 дрожжевой клетки ( $p<0,05$ ), показатель завершенности фагоцитоза — 276,2 против 143,5 дрожжевой клетки ( $p<0,05$ ). В то же время использование ронколейкина до операции (3-я группа) по сравнению с контрольной группой привело к значимой коррекции только одного показателя — фагоцитарного числа.

Снижение под влиянием ронколейкина распространенности специфического воспаления в костной ткани, в том числе альтеративного компонента воспаления, по регистрации очагов с некрозом и ядерным детритом, а также некротизированных балок, вероятно, является проявлением протективного эффекта препарата, установленного ранее при туберкулезе легких [12].

Стимулирующее действие ронколейкина на фагоцитоз, ингибированный у кроликов с туберкулезным гонитом [13], вероятно, является следствием восстановления иммунокорректором субпопуляционного баланса Th1 и Th2 в сторону преобладания лимфоцитов Th1, которые продуцируют IFN- $\gamma$  — один из важнейших путей активации макрофагов. Стимуляция миелоидного, эритроидного и мегакариоцитарного ростка кроветворения, скорее всего, также обусловлена активацией ронколейкином клональной пролиферации Т-лимфоцитов, обладающих способностью усиливать и эритропоэз [14].

Сопряженность нормализации функциональной активности макрофагов с усилением репаративного остеогенеза, зарегистрированная при использовании ронколейкина, подтверждает данные литературы о тесной взаимосвязи состояния макрофагов не только с дифференциацией клеток фибробластического ряда [4], но и с формированием регенерата. Так, под действием магнитолазерного воздействия, активирующего фагоциты, установлено ускорение консолидации большеберцовой кости при резекции последней [15].

Более высокая результативность использования ронколейкина в послеоперационном периоде костной пластики по сравнению с дооперационным вполне закономерна, поскольку при последнем к иммунодефициту, сопровождающему течение самой туберкулезной инфекции [16], присоединяется резкое угнетение иммунного статуса, вызванное любой тяжелой операцией. Так, признаки подавления иммунитета, коррелирующие с замедлением остеогенеза, выявлены и в раннем послеоперационном периоде у больных с повреждением лицевого скелета [5].

## Заключение

Включение ронколейкина (12,5 мкг/кг, 5 инъекций) в состав комплексной терапии экспериментального туберкулезного остита в послеоперационном периоде комбинированной костной пластики операционных дефектов (аутокость + OsteoSet-T) привело к ускорению регрессии специфического воспаления и существенному усилению репаративного остеогенеза.

Инволюция туберкулезного поражения при применении ронколейкина в эффективном режиме характеризовалась уменьшением дистрофических процессов в костной и хрящевой ткани через 1 мес после пластики; снижением распространенности очагов специфического воспаления в костной ткани через 6 мес после пластики; уменьшением выраженности альтеративно-некротического компонента воспаления в костной ткани на обоих сроках наблюдения; стимуляцией кроветворения в костном мозге (гиперплазия, активация мегакариоцитарного и эритроидного ростка на обоих сроках наблюдения и миелоидного ростка гемопоэза через 6 мес после операции); повышением интенсивности остеогенеза с новообразованием костных балок через 6 мес после пластики.

Выявлена существенная стимуляция ронколейкином поглотительной и переваривающей активности перитонеальных макрофагов, угнетенных при экспериментальном

туберкулезном остите через 1 и 6 мес после комбинированной пластики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Eming S.A., Hammersmidt M., Krieg T., Roers A.* Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2009; 20 (5): 517–27.
2. *Ge X., Ma X., Meng J., Zhang C., Ma K., Zhou C.* Role of Wnt-5A in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase expression in rabbit temporomandibular joint condylar chondrocytes. *Arthr. Rheum.* 2009; 60 (9): 2714–22.
3. *Kim H.J., Song S.B., Choi J.M., Kim K.M., Cho B.K., Cho D.H. et al.* IL-18 downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130 (3): 706–15.
4. *Мусина Л.А.* Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Саранск; 2007. 49 с.
5. *Бердюгина О.В., Бердюгин К.А.* Иммунологические критерии прогнозирования замедленной консолидации костной ткани. *Травматология и ортопедия России.* 2009; 2: 59–66.
6. *Ерохин В.В.* О некоторых механизмах патогенеза туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких.* 2009; 11: 3–8.
7. *Омар Х.М.* Эффективность иммунокоррекции в комплексном оперативном лечении переломов нижней челюсти: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Краснодар; 2012. 27 с.
8. *Громов М.И., Пивоварова Л.П.* Применение иммуномодулятора деринат в лечении хирургических больных с тяжелым сепсисом. *Фундаментальные исследования.* 2012; 7 (2): 289–95.
9. *Ирышкова О.В.* Использование иммуномодуляторов и мембранопротекторов в комплексной фармакотерапии обострения хронического катарального генерализованного гингивита: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Курск; 2012. 24 с.
10. *Чердаков В.Ю., Смахтин М.Ю., Дубровин Г.М., Бобынцев И.И.* Применение регуляторных пептидов: тимогена, даларгина, глицил-гистидил-лизина и их комбинаций для коррекции нейтрофильного звена антиинфекционного иммунитета при переломе бедренной кости. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2012; 2: 40–3.
11. Пат. 2421823 РФ МПК G09B23/28. Способ моделирования туберкулезного остита различной степени тяжести. *Васильева С.Н., Кафтырев А.С., Виноградова Т.И., Сердобинцев М.С., Заболотных Н.В.* Заявитель и патентообладатель ФГБУ СПбНИИФ. №2009140048/14. Заявл. 29.10.09; опубл. 20.06.11. Бюл. №17.
12. *Сапожникова Н.В., Павлова М.В., Виноградова Т.И., Арчакова Л.И., Заболотных Н.В., Кондакова М.Н.* Эффективность ронколейкина в комплексной терапии экспериментального и клинического туберкулеза. *Профилактическая и клиническая медицина.* 2011; 39 (2): 185–9.
13. *Заболотных Н.В., Васильева С.Н., Кафтырев А.С. Витовская М.Л., Виноградова Т.И., Репин Ю.М.* Активность макрофагов и полиморфно-ядерных лейкоцитов в ходе развития экспериментального туберкулезного остита. *Туберкулез и болезни легких.* 2013; 4: 50–3.
14. *Захаров Ю.М., Фекличева И.В.* О влиянии эритропоэтина и Т-лимфоцитов на эритропоэз в культуре эритробластических островков костного мозга полицитемичных крыс. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2009; 1: 81–4.
15. *Базарный В.В., Шеколдин П.И., Исайкин А.И., Крохина Н.В., Тихонина Е.А.* Особенности репаративного остеогенеза при стимуляции функциональной активности фагоцитов. *Медицинская иммунология.* 2007; 9 (2–3): 117–8.
16. *Nicod L.P.* Immunology of tuberculosis. *Swiss Med. Wkly.* 2007; 137 (25–26): 357–362.

Поступила 15.07.2013