

**Кузнецова Юлия Константиновна**

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ  
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗООНОЗНОГО КОЖНОГО ЛЕЙШМАНИОЗА НА  
ЛАБОРАТОРНОЙ МОДЕЛИ**

03.02.11 – паразитология

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Москва – 2018**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первом Московском государственном медицинском университете имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Коваленко Феликс Павлович**

**Официальные оппоненты:**

**Довгалев Анатолий Семенович** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра тропических, паразитарных болезней и дезинфекционного дела, заведующий кафедрой.

**Соколова Татьяна Вениаминовна** – доктор медицинских наук, профессор, Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. на заседании диссертационного совета Д.208.040.15 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

**Козовенко Михаил Никонович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Лейшманиозы – паразитарные, трансмиссивные болезни людей и животных, распространенные в странах с жарким климатом. Их регистрируют в 98 странах мира. Более 350 млн. человек (около 10% населения земного шара) находятся в зоне риска. Более 12 млн. человек уже инфицированы, а ежегодное число новых случаев эксперты оценивают в 1,3-2 млн. [ВОЗ, 2010; 2018]. После распада СССР за пределами РФ остались эндемичные по лейшманиозу территории Закавказья и Средней Азии. Единичные местные случаи висцерального лейшманиоза регистрируют на территориях Дагестана и Крыма. Однако проблема зоонозного кожного лейшманиоза (ЗКЛ) в настоящее время актуальна для практикующих врачей. Это обусловлено миграцией населения РФ в эндемичные по лейшманиозу регионы (туристические поездки, служебные командировки, работа по контракту и др.). В Россию также нередко приезжают люди из стран Ближнего Востока, Азии, Африки и Латинской Америки, где ЗКЛ регистрируют достаточно часто. Об этом свидетельствуют многочисленные публикации о выявлении завозных случаев кожного [Тищенко Л.Д. и соавт., 2001; Заславский Д.В. и соавт., 2014; Тумольская Н.И. и соавт., 2014; Бодня Е.И. и соавт., 2014; Рахматов А.Б. и соавт., 2014; Добрев Х.П. и соавт., 2015; Мицура В.М. и соавт., 2016; Тихоновская И.В. и соавт., 2016; Исаева М.С., Саидова Т.О., 2016] и висцерального лейшманиоза [Александрова О.К. и соавт., 2008; Лазарев В.В., 2010; Богадельников И.В., 2014; Баранец М.С. и соавт., 2017; В.Ч. Джалилов, 2017]. В РФ с 1991 по 2014 год зарегистрировано 89 случаев лейшманиоза (83 – завозных и 24 стран, 6 – местное заражение на территории РФ) [Понировский Е.Н. и соавт., 2015]. Это свидетельствует об актуальности КЛ для населения неэндемичных стран, каковой является Россия.

У врачей практического здравоохранения возникают серьезные проблемы как в диагностике [Тумольская Н.И. и соавт., 2014; Бодня Е.И. и соавт., 2014; Исаева М.С., Саидова Т.О., 2016], так и в выборе метода лечения [Заславский Д.В. и соавт., 2014; Тихоновская И.В. и соавт., 2016]. ЗКЛ спорадически завозят в Россию из стран Северной Африки (Египет, Тунис), Ближнего Востока (Турция, Израиль, Иордания), СНГ (Азербайджан, Армения, Узбекистан, Таджикистан), Грузии, где основным возбудителем является *Leishmania major* (*L. major*), вызывающим у человек ЗКЛ [McGwire B.S., Satoskar A.R., 2014], что определило выбор инфекционного агента.

Стандарты лечения ЗКЛ в нашей стране отсутствуют. В национальном руководстве по дерматовенерологии (2013) предлагается использовать 12 препаратов, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств (ГРЛС) МЗ РФ. Однако в инструкциях фирм производителей показания для лечения данного дерматоза имеются только у кетоконазола. Хорошо зарекомендовавший себя антибиотик из группы аминогликозидов (мономицин) в

настоящее время в России не производится. Препарат 5-валентной сурьмы (соллусурьмин), поставлявшийся из Туркмении, в ГЛРС РФ не зарегистрирован. В рекомендациях ВОЗ (2010), в Руководстве по ведению случаев и эпиднадзору за лейшманиозами в Европейском регионе ВОЗ (2018) для лечения ЗКЛ предлагают меглумина антимонат (глюкантим), стибоглюконат натрия (пентастам), милтефозин (импавидо), липосомальный амфотерицин В (амбисом), паромомицин, аминохинол, пентамидин. Из перечисленных препаратов в ГЛРС имеется только амфотерицин В (не липосомальный), а в инструкции фирмы производителя нет показаний для лечения КЛ.

В связи с этим ценными являются публикации авторов, лечивших больных ЗКЛ антибиотиками различных фармакологических групп. Это доксициклин [Masmoudi A. et al., 2008] и цефотаксим (клафоран – цефалоспорин 3 поколения) [Шуйкина Э.Е. и соавт., 2009]. В то же время данные о доклинических исследованиях данных препаратов в литературе отсутствуют. Учитывая, что цефотаксим – импортный препарат (Франция), для импортозамещения актуальным является изучение отечественного антибиотика из той же группы – цефтриаксона. Универсальным препаратом для лечения лейшманиозов являются препараты 5-валентной сурьмы. Поэтому меглумина антимонат может быть использован в качестве контроля.

Исследования зарубежных специалистов, свидетельствуют, что этиологическим фактором заболевания могут быть не лейшмании, а вирус, находящийся в них (LRV – лейшманиальный РНК-вирус), обнаруженный в 1988 г. у больного, инфицированного *L. guyanensis* [Tarr P.I. et al., 1988]. Позднее его обнаружили в *L. braziliensis* и указали на связь с более тяжелым течением КЛ [Kariyawasam R. et al., 2017]. Установлена корреляция между наличием вируса и иммунным ответом хозяина. Назначение препаратов сурьмы, разрушающих паразитов, приводит к распространению инфекции [Ives A. et al., 2014]. Это явление можно назвать эндоцитобиозом вируса внутри лейшманий. При заражении хомяков лейшманиями, содержащими LRV, отмечен сильный воспалительный ответ за счет повышения уровня IFN- $\beta$  и продление выживаемости паразитов с вирусом [Ives A. et al., 2014]. Это послужило основанием для изучения в доклиническом исследовании эффективности комбинированной терапии с включением противовирусного препарата – интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного. Вышеизложенное послужило поводом для сравнения *in vitro* и *in vivo* эффективности действия моно- и комбинированной терапии перечисленных препаратов на возбудителя ЗКЛ (*L. major*).

**Цель исследования:** изучить *in vitro* и *in vivo* на лабораторной модели эффективность препаратов для лечения зоонозного кожного лейшманиоза и дать им сравнительную оценку.

**Задачи исследования:** 1. В эксперименте *in vivo* дать клиническую характеристику особенностей течения зоонозного кожного лейшманиоза у золотистых хомяков, использованных в качестве лабораторной модели.

2. Изучить *in vitro* специфическую активность доксициклина (Россия), цефотаксима (клафорана, Франция) и цефтриаксона (Россия), применяемых по данным литературы для лечения кожного лейшманиоза, сравнив их эффективность с меглумина антимономатом.

3. В эксперименте на лабораторной модели изучить токсичность препаратов – доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона, меглумина антимономата и интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона).

4. Провести сравнительный анализ эффективности монотерапии антибактериальными препаратами (доксициклином, цефотаксимом, цефтриаксоном), препаратом 5-валентной сурьмы (меглумина антимономатом) и интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным при лечении экспериментального ЗКЛ у золотистых хомяков.

5. Обосновать целесообразность использования интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (реаферона) в комплексной антилейшманиальной терапии.

**Научная новизна работы:** впервые *in vitro* проведена сравнительная оценка трех антибиотиков (доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона) на промастиготы лейшманий с учетом их минимальных доз, количества протистов в поле зрения и показателя инактивации их подвижности. Установлено лидерство доксициклина и цефтриаксона. Минимальные дозы обоих препаратов приводят к абсолютному подавлению подвижности возбудителя. Повышение терапевтической дозы препаратов не обосновано. Сравнение этих препаратов с меглумина антимономатом показало их превосходство по всем показателям.

Впервые в эксперименте *in vivo* на золотистых хомяках доказано отсутствие токсического действия антибиотика доксициклина и иммуномодулятора интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного и установлен выраженный токсический эффект препаратов из группы цефалоспоринов III поколения – цефотаксима и цефтриаксона.

Впервые *in vivo* доказана высокая специфическая активность антибиотика доксициклина при экспериментальном ЗКЛ у золотистых хомяков. В исследованиях *in vitro* эффективность цефтриаксона была высокой, в *in vivo* – животные погибали.

Впервые *in vivo* установлен факт повышения эффективности доксициклина и меглумина антимономата в комплексной терапии с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным. Выявлен синергизм данных препаратов.

**Теоретическая и практическая значимость работы:** при количественном учете числа промастигот установлено преобладание специфической активности цефтриаксона над доксициклином в 2,6 раза (2,250 и 5,083) при *min* терапевтических дозах обоих. При этом *min* терапевтическая доза первого в 15 раз больше, чем второго (0,009 г и 0,0006 г, соответственно).

Золотистые хомяки, являющиеся «золотым стандартом» для воспроизведения экспериментальной модели ВЛ, могут быть использованы и для ЗКЛ.

Учитывая эффективность цефтриаксона в эксперименте *in vitro* и доказанную его токсичностью в эксперименте *in vivo*, требуется его дополнительное изучение. Доказанный *in vivo* факт высокой антилейшманиальной эффективности доксициклина при экспериментальном ЗКЛ, повышение его эффективности в сочетании с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным расширяет показания для их использования.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Доксициклин и цефтриаксон *in vitro* обладают высокой специфической активностью в отношении возбудителя ЗКЛ, значительно большей, чем меглумина антимононат.
2. Доксициклин, меглумина антимононат и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный при изучении их токсичности *in vivo* на золотистых хомяках не обладают таковой. Выраженной токсичностью обладают цефотаксим и цефтриаксон.
3. Меглумина антимононат и доксициклин эффективны при лечении ЗКЛ у золотистых хомяков. Цефтриаксон и цефотаксим в терапевтической дозе вызывают их гибель. Комплексная терапия (меглумина антимононат / доксициклин + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный) обладает более высокой эффективностью в сравнении с монотерапией.

**Личный вклад автора.** Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, сформулированы цели и задачи, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту. Разработан дизайн исследования. Вся экспериментальная работа *in vivo* и *in vitro* с регистрацией полученных результатов в специальных журналах и статистическая обработка полученных данных выполнены самостоятельно. Лично написаны статьи, настоящая диссертация, подготовлены доклады и презентации на научных конференциях.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова; кожных и венерических болезней с курсом медицинской косметологии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ; дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная Государственная Медицинская Академия» Управления делами Президента РФ; кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО «Оренбургский Государственный медицинский университет» МЗ РФ; дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» МЗ РФ.

**Степень достоверности и апробация результатов:** Материалы исследования доложены и обсуждены на Всероссийском конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (С-Пб, 2014); на научно-практических конференциях с международным участием «Инфекции и противоинфекционный контроль в дерматологии» (Москва, 2017, 2018). Апробация диссертации состоялась в Институте медицинской

паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского (Москва, 27.08.2018).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует шифру научной специальности: 03.02.11 «Паразитология» и формуле специальности. Область исследований при ЗКЛ соответствует пункт 6 (изучение клиники болезни у животных), 7 (разработка новых методов лечения паразитарных болезней).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них: 2 статьи с материалами собственных исследований и 3 статьи обзорные в рецензируемых журналах ВАК РФ; 1 руководство; 4 тезиса конференций; 2 статьи в журналах, не рецензируемых ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 118 источников, в том числе 44 отечественных и 74 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 19 рисунками.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Экспериментальный раздел работы выполнен в Институте медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Изучена активность нескольких лекарственных препаратов, зарегистрированных в России: антибиотики доксицилин (Россия), цефотаксим (Франция) и цефтриаксон (Россия), а также интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный. Препарат 5-валентной сурьмы меглума антимоноат использовали в контрольной группе.

Для выполнения поставленных задач применены следующие методы исследования.

1. *Выбор лабораторной модели животного.* В исследовании в качестве лабораторной модели использовали золотистых хомяков – *Golden Syrian hamster* (GSH) – классическую модель для висцерального лейшманиоза [Миронов и соавт. А.Н., 2012]. Выбор GSH был обусловлен и тем, что использованная лабораторная культура *L. major*, хранилась долгое время в криобанке института и требовала поиск более чувствительной экспериментальной модели для заражения.

2. *Отбор биологического материала для заражения лабораторных животных.* Для этой цели использованы штаммы, хранящиеся в криобанке Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е. И. Марциновского Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. По журналу отбирали наиболее вирулентные штаммы *L. major*. Биомасса считалась годной для проведения исследований при среднеарифметической численности промастигот в поле зрения 72, что соответствовал 28000000 паразитов в 1 мл двухфазной среды.

3. *Изучение специфической активности препаратов для лечения ЗКЛ in vitro.* Культура *L. major* получена от больных, проживавших в эндемичных по КЛ регионах Узбекистана. Возбудитель выделялся путем аспирации из очага инфекции. Для оценки специфической активности препаратов *in vitro* применяли методику из в «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н.Миронова (2012). Увеличение *min* концентрации препаратов в несколько раз (*max* доза) дало возможность выяснить влияние их концентрации на специфическую антилейшманиальную активность.

4. *Изучение токсичности* проводилось по методике, описанной в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией проф. А.Н.Миронова (2012) с коррекцией на имеющиеся разрешения для использования этих препаратов в клинической практике. Были отобраны по 5 GSH для каждого изучаемого препарата. Суточная терапевтическая концентрация препаратов определялась максимальной концентрацией, рекомендованной инструкцией для человека со среднестатистическим весом 60 кг для внутримышечного введения. Осуществляли последовательное увеличение концентрации изучаемых антибактериальных препаратов в 5 и 10 раз, меглума антимоноата – в 3 и 5 раз, интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного – в 10 и 20 раз. Максимальный период наблюдения за животными составлял 3 нед. Токсичность препарата оценивалась по изменению массы тела животных на 16-ый и 21-ый дни эксперимента по сравнению с исходной. Учитывались их поведенческие реакции и изменение аппетита, в некоторых случаях смерть GSH.

5. *Изучение эффективности препаратов in vivo на лабораторной модели ЗКЛ. Этапы.*

- Подготовка инфекционного материала для заражения. Экспериментальный ЗКЛ воспроизводили промастиготами лейшманий, которые культивировали на питательных средах. Для сохранения вирулентности биомассы высоковирулентных штаммов *L. major* проводился 1-2-кратный пассаж возбудителей на питательных средах. Культуру лейшманий выращивали при температуре 23–25°C на среде NNN. Для заражения использовали 10-14- дневную культуру. Взвесь для инфицирования была годной при концентрации паразитов  $10^6$  в 0,05 мл.
- Методика введения инфекционного агента. Каждому животному путем внутрикожной инъекции вводили около 2 млн. паразитов в виде суспензии культуры *L. major*. Инъекции делали в две области: пах и уши. Это увеличивало вероятность развития инфекционного. Обязательным условием являлось появление в месте инъекции эффекта «лимонной корочки».
- Критерии отбора GSH для эксперимента *in vivo*. Основным критерием являлась степень местного поражения кожи, которая определялась по специальной шкале: «0» – отсутствие поражения; «+» – инфильтрация; «++» – изъязвление; «+++» – образование язвы с коркой;



«++++» – обширная язва; «++» – затихание процесса, начало эпителизации; «+» – дальнейшее заживление, сопровождающееся шелушением; «0» – полная эпителизация.

- Визуальная оценка эффективности препаратов по динамике кожного процесса. Для этого использовали животных при степени местного поражения «+++» и «++++». Рассчитывался средний показатель поражения кожи в каждой группе до начала лечения и после завершения курса терапии. Он равнялся сумме всех крестов в группе, деленной на число животных в ней. Учитывался размер язв, который определялся измерением ее длины и ширины с последующим вычислением площади очага поражения в см<sup>2</sup> по формуле:  $S = \frac{1}{2}D \times \frac{1}{2}d \times \pi$ , где D – длина большой оси эллипса, d – длина малой оси эллипса,  $\pi = 3,14$ . Сумма площадей отдельных язв, деленная на число животных в группе, составляет средний размер лейшманиомы для этой группы животных. Дополнительным критерием являлась глубина поражения, которая регистрировалась в специальном журнале учета. Все критерии определяли каждую неделю.

- Микроскопическая оценка эффективности лечения по элиминации возбудителя из очагов поражения. Для этого проводили подсчет количества лейшманий в мазках, с использованием шкалы: «0» – отсутствие лейшманий; «+» – 1 лейшмания на 1–9 полей зрения; «++» – от 2 до 10 лейшманий в 1-м поле зрения; «+++» – от 11 до 50 лейшманий в 1-м поле зрения; «++++» – более 50 лейшманий в 1-м поле зрения. Микроскопию отделяемого язвы проводили 2 раза в месяц.

- Проводили фоторегистрацию динамики кожного процесса у животных до начала лечения, на 30-й и на 60-й дни от начала лечения.

6. *Статистическая обработка материала.* Обработка результатов исследований проведена с использованием пакета статистических программ “STATISTICA 6.0». Данные шифровали в программе EXCEL. Описательная статистика количественных признаков представлена средними и среднеквадратичными отклонениями (в формате  $M \pm m$ ). Для анализа нормально распределенных признаков применяли параметрические методы (t-критерий Стьюдента).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Исследование эффективности препаратов для терапии ЗКЛ *in vitro*.** Для проведения исследований использовались высоковирулентные штаммы культуры *L. major*. Изучали активность трех антибактериальных препаратов (опытные группы): цефотаксим (Франция), цефтриаксон (Россия), доксициклин (Россия). Контрольные группы: 1 группа – пробирки с жидкой средой 199 с солями Хенкса (требования протокола); 2 группа – меглумина антимононат (МА), являющийся «золотым стандартом» при лечении любых форм лейшманиоза.

Культуру лейшманий на кровяных средах поддерживали без применения антибиотиков. В контрольные пробирки вносили чистую среду, а в опытные пробирки – среду, в которую предварительно добавили суспензию промастигот лейшманий. Смесь разливали по мини-пробиркам в объеме 0,47 мл, затем в каждую опытную пробирку вносили двукратные разведения испытуемых веществ, в объеме 0,03 мл. Через 5 дней инкубации при 22–25°C в темноте содержимое пробирок исследовали в свежем и окрашенном мазке. Определяли минимальную концентрацию препарата, которая полностью подавляет рост промастигот.

Последовательное увеличение концентрации препаратов по методике проводилось пошагово – в 2, 4, 6, 8, 10 раз. Разведение порошков лекарственных препаратов проводили в соответствии с инструкциями фирм производителей. Анализ результатов дан с использованием двух вариантов концентраций, обозначенных как *min* и *max*. В связи с тем, что форма выпуска МА – раствор, то увеличение концентрации в 6, 8 и 10 раз привело бы к излишнему объему в испытуемых пробирках, поэтому увеличение концентрации МА проводилось только в 2 и 4 раза. В опытах было три варианта концентрации с 0,009 г, 0,018 г и 0,036 г (*max*) в растворе.

*Min* концентрация препаратов доксициклин, цефотаксим, цефтриаксон в 10 раз отличалась от *max*. Данная серия опытов повторялась трижды.

*Результаты исследования эффективности доксициклина in vitro.* В опытах было шесть вариантов концентрации в растворе: 0,0006; 0,0012; 0,0024; 0,0036; 0,0048; 0,006. Проведено сравнение эффективности *min* (0,0006 г) и *max* (0,006 г) доз доксициклина с двумя контрольными группами – МА и питательная среда 199. Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *min* дозами препаратов: доксициклина (5,083 при *min* дозе 0,0006 г) и МА (7,92 при *min* дозе 0,009 г) показало, что специфическая активность доксициклина в 1,6 раза выше, чем МА ( $p < 0,05$ ). Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *max* дозами препаратов: доксициклина (3,167 при *max* дозе 0,006 г) и МА (5,42 при *max* дозе 0,036 г) свидетельствует, что специфическая активность доксициклина достоверно в 1,7 раза выше, чем у МА ( $p < 0,05$ ). В контрольных пробирках с 0,03 мл среды 199 число промастигот несколько уменьшилось по сравнению с исходным значением за счет естественной гибели паразитов вследствие отсутствия пассажей и твердой фазы питательной среды. Увеличение *min* терапевтической дозы доксициклина в 10 раз лишь в 1,6 раза увеличивало его эффективность (5,083 против 3,167 промастигот в одном поле зрения). При использовании, как *min*, так и *max* доз, подвижные формы не выявлены, что является доказательством эффективности *min* дозы препарата, обладающей ингибирующей активностью.

*Результаты исследования эффективности цефотаксима in vitro.* В опытах было шесть вариантов концентрации в растворе: 0,0075; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,075. Проведено сравнение эффективности *min* (0,0075 г) и *max* (0,075 г) доз цефотаксима с двумя контрольными группами

– МА и питательная среда 199. Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *min* дозами препаратов: цефотаксима (8,917 при *min* дозе 0,0075 г) и МА (7,92 при *min* дозе 0,009 г) свидетельствует, что специфическая активность цефотаксима идентична таковой у МА ( $p>0,05$ ). Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *max* дозами препаратов: цефотаксима (4,672 при *max* дозе 0,075 г) и МА (5,42 при *max* дозе 0,036 г) свидетельствует, что специфическая активность цефотаксима идентична таковой у МА ( $p>0,05$ ). Увеличение *min* терапевтической дозы цефотаксима в 10 раз в 1,9 раза увеличивает его эффективность (8,917 против 4,672 промастигот в одном поле зрения). Отсутствие подвижных форм промастигот отмечается лишь при *max* дозе, увеличенной в 10 раз рекомендованной инструкцией. Это указывает на необходимость проверки безопасности этой дозы в исследовании *in vivo*.

*Результаты исследования эффективности цефтриаксона in vitro.* В опытах было шесть вариантов концентрации в растворе: 0,009; 0,018; 0,036; 0,054; 0,072; 0,09. Проведено сравнение эффективности *min* (0,009 г) и *max* (0,09 г) доз цефтриаксона с двумя контрольными группами – МА и питательная среда 199. Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *min* дозами препаратов: цефтриаксона (2,25 при *min* дозе 0,009 г) и МА (7,92 при *min* дозе 0,009 г) свидетельствует, что специфическая активность цефтриаксона достоверно в 3,5 раза выше, чем у МА ( $p<0,05$ ). Сравнение числа промастигот в трех пробирках с *max* дозами препаратов: цефтриаксона (1,42 при *max* дозе 0,09 г) и МА (5,42 при *max* дозе 0,036 г) показало, что специфическая активность цефтриаксона достоверно в 3,8 раза выше, чем у МА ( $p<0,05$ ). Увеличение *min* терапевтической дозы цефтриаксона в 10 раз лишь в 1,6 раза увеличивает его эффективность (2,25 против 1,42 промастигот в одном поле зрения). При использовании, как *min*, так и *max* доз цефтриаксона, подвижные формы не выявлены, что является доказательством эффективности *min* дозы, которая обладает высокой ингибирующей активностью. Сравнительный анализ эффективности препаратов *in vitro* представлен в таблице 1.

Таблица 1 – *Min* и *max* терапевтические концентрации антибиотиков во взвеси паразитов

| МНН         | Доза, г           | Лейшмании в одном поле зрения |                          |
|-------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------|
|             |                   | Количество промастигот        | Подвижность промастигот* |
| Доксициклин | <i>min</i> 0,0006 | 5,083                         | -                        |
|             | <i>max</i> 0,006  | 3,167                         | -                        |
| Цефтриаксон | <i>min</i> 0,009  | 2,250                         | -                        |
|             | <i>max</i> 0,09   | 1,420                         | -                        |
| Цефотаксим  | <i>min</i> 0,0075 | 8,917                         | +                        |
|             | <i>max</i> 0,075  | 4,672                         | -                        |
| МА          | <i>min</i> 0,009  | 7,920                         | ++                       |
|             | <i>max</i> 0,036  | 5,420                         | ++                       |
| Контроль    | Среда 199         | 19,160                        | ++                       |

\*Использовались обозначения: «-» – неподвижные лейшмании; «+» – малоподвижные лейшмании, зачастую движения только жгутика, без передвижения; «++» – активные лейшмании, передвигающиеся по всему полю зрения свободно.

Ингибирующая активность препаратов при *min* дозе составляла 2,25 (цефтриаксон); 5,083 (доксциклин); 8,917 (цефотаксим) промастигот в поле зрения. Она уменьшалась от препарата к препарату в 2,3 и 1,8 раза. В то же время инактивация подвижности промастигот наступала при дозе доксициклина в 15 раз меньшей, чем цефтриаксона (0,0006 г против 0,009 г, соответственно). Все визуализируемые особи были неподвижными при *min* дозах. При *min* дозе цефотаксима (8,917) ингибирующая активность была слабой, т.к. отмечались колебания жгутиков.

Сравнение двух контрольных групп свидетельствует, что в 1-ой контрольной группе с использованием МА *min* ингибирующая активность препарата составляла 7,92 жгутиковых в поле зрения, что в только в 2,2 раза меньше, чем во 2-ой контрольной группе (среда 199 – 19,16). При этом имели место активные лейшмании, передвигающиеся свободно по всему полю зрения. Не исключено, что это связано с несколько заниженной концентрацией препарата в связи с использованием его жидкой лекарственной формы. Эксперимент *in vivo* даст возможность получить более достоверные данные. Увеличение терапевтической концентрации препаратов в 4 раза (МА) и в 10 раз (антибиотики) свидетельствует о незначительном повышении специфической активности: только в 1,5 раза для МА (5,42 против 7,92); 1,6 раза для доксициклина (3,167 против 5,083); в 1,5 раза для цефтриаксона (1,42 против 2,25) и в 1,9 раза для цефотаксима (4,672 против 8,917). Увеличение терапевтической концентрации в клинической практике не рекомендуется и не оправдано, т.к. минимальная концентрация уже обладает ингибирующей активностью.

**Проверка на лабораторной модели токсичности препаратов с противолейшманиальным эффектом, доказанным *in vitro*.** Для изучения токсичности указанных препаратов использовали методику, принятую в клинической фармакологии для доклинических исследований на животных [Миронов А.Н., 2012]. Для этой цели отобраны по 5 GSH для каждого изучаемого препарата. Доза препаратов рассчитывалась исходя из максимальной рекомендуемой дозы по инструкции фирмы производителя для человека со среднестатистическим весом 60 кг. Для GSH эта доза определялась на 100 г массы тела. Максимальный период наблюдения за животными составил 3 нед. Максимальная терапевтическая доза доксициклина составила 0,00033 г на 100 г массы животного. Препарат вводили в/м однократно в дозировках, превышающих максимальную в 5 раз (1 и 2 животные), а также – в 10 раз (3-5 животные) (табл. 2).

Таблица 2 – Оценка токсичности доксициклина *in vivo* на GSH

| № GSH и разведение доксициклина | Количество препарата на 100 г массы GSH (г) | Количество вещества, введенного в/м (г) | Масса GSH (г) |            |            |
|---------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|------------|------------|
|                                 |                                             |                                         | 1 день        | 16 день    | 21 день    |
| №1 в 5 раз                      | 0,0016*                                     | 0,0014                                  | 90            | 93 (+3,3%) | 94 (+4,4%) |
| №2 в 5 раз                      | 0,0016 *                                    | 0,0016                                  | 103           | 106 (+3%)  | 108 (+5%)  |

|             |          |        |     |             |             |
|-------------|----------|--------|-----|-------------|-------------|
| №3 в 10 раз | 0,0032*  | 0,0033 | 102 | 102 (0%)    | 105 (+3%)   |
| №4 в 10 раз | 0,0032 * | 0,0036 | 111 | 116 (+4,5%) | 120 (+8,1%) |
| №5 в 10 раз | 0,0033*  | 0,004  | 122 | 125 (+2,5%) | 123 (+1%)   |

\*рекомендованное инструкции количество препарата в пересчете на 100 г веса лабораторной модели, увеличенное в 5 и 10 раз

Вес GSH до начала эксперимента колебался от 90 до 122 г. После введения дозы доксициклина, превышающей терапевтическую в 5 раз, масса первого GSH к 16 дню увеличилась на 3,3 %, а к 21– на 4,4%, а второго – на 3% и 5%. Практически аналогичные данные получены при увеличении дозы доксициклина в 10 раз. Спустя 16 дней масса двух GSH увеличилась на 2,5% (№5) и на 4,5% (№4), а одного (№3) – не изменилась. Через 3 нед. прирост массы тела зарегистрирован у всех GSH на 1% (№5) – 8,1% (№4). Погибших GSH не было. Отмечено лишь небольшое снижение активности поведения. Токсичности доксициклина отсутствовала при повышении терапевтической дозы препарата в 5 и даже – в 10 раз.

Оценка токсичности цефотаксима *in vivo* на GSH. В соответствии с инструкцией максимальная дозировка цефотаксима составляла 0,0133 г на 100 г животного. Его вводили в/м трем животным в дозировке в 5 раз, превышающей *тах*, а двум – в 10 раз. Вес GSH до начала исследования был в пределах от 93 до 132 г. После введения дозы цефотаксима, превышающей терапевтическую в 5 раз, масса GSH к 16 дню уменьшился на 23,7% (№3) – 37,4% (№1). При увеличении дозы в 10 раз оба GSH (№4 и №5) погибли на 16 день. Их посмертная масса тела была на 43,2% (№4) и 35,1% (№5) меньше исходной. Спустя 3 нед. после введения дозы, превышающей в терапевтическую в 5 раз, погибли остальные три GSH. Посмертная масса животных была ниже исходной на 26,9% (№2) – 35,1% (№1). У всех GSH потеря массы тела сопровождалось диареей, снижением аппетита и активности животных. Это свидетельствует о высокой токсичности цефотаксима.

Оценка токсичности цефтриаксона *in vivo* на GSH. В соответствии с инструкцией максимальная дозировка цефтриаксона составляла 0,0067 г на 100 г животного. Его вводили внутримышечно однократно трем животным в дозировке в 5 раз, превышающей *тах*, а двум – в 10 раз. Вес GSH до начала исследования был в пределах от 89 до 113 г. На 16 день была зарегистрирована потеря массы тела у всех животных от 14,6% (№3) до 20,6% (№5). В отличие от цефотаксима в этой группе, все GSH погибли несколько позже – к концу 21 дня. Их посмертная масса тела к 21 дню уменьшилась вдвое 40,5% (№3) – 53,3% (№1). Во всех случаях потеря массы тела сопровождалось выраженной диареей, снижением аппетита и активности животных. Это свидетельствует о токсичность цефтриаксона.

Оценка токсичности МА *in vivo* на GSH. В соответствии с инструкцией максимальная дозировка МА составила 0,01 г на 100 г массы животного. Препарат вводили в/м однократно в дозировках, превышающих *тах* в 3 раза (№1 и №2), а также – в 5 раз (№3-5). Увеличение дозы в 10 раз не проводилось, что связано с особенностями лекарственной формы выпуска препарата

(раствор). Если дозу увеличить в 10 раз, то животному следовало вводить 3,3 мл МА, что несоизмеримо с размером животного. С другой стороны, МА применяется для лечения ЗКЛ много десятилетий и считается «золотым стандартом» терапии. Вес GSH до начала исследования был в пределах от 85 до 122 г.

При увеличении дозы МА в 3 раза на 16 день масса тела GSH №1 и №2 практически не изменилась. Через 21 день у GSH №1 она была стабильной, а у №2 – возросла на 7,2%. При увеличении терапевтической дозы в 5 раз на 16 день у двух GSH масса тела увеличилась на 1% (№4) и на 5,9% (№5). У GSH №3 снизилась на 3,7%. На 21 день масса GSH увеличилась и 3,5%(№5) и на 6,1% (№4). У животного №3 она снизилась на 8,7% по сравнению с исходной массой ( $p>0,05$ ). При увеличении терапевтической дозы в 5 раз на 16 день у двух GSH масса тела увеличилась на 1% (№4) и на 5,9% (№5). У GSH №3 снизилась на 3,7%. На 21 день масса GSH увеличилась и 3,5%(№5) и на 6,1% (№4). У животного №3 она снизилась на 8,7% по сравнению с исходной массой ( $p>0,05$ ). Таким образом, очередной раз доказано отсутствие токсического действия МА на экспериментальных животных.

Оценка токсичности ИФ *in vivo* на GSH (табл. 3). В соответствии с инструкцией максимальная дозировка ИФ составляла 10000 МЕ на 100 г животного. GSH №1 и №2 вводили дозу, в 10 раз превышающую терапевтическую дозу, а трем животным – в 20 раз. Такой подход был связан с желанием экспериментально оценить наличие антилейшманиальной активности у препарата из группы иммуномодуляторов с противовирусным эффектом. ИФ вводили однократно в/м. ИФ не оказывал токсического действия на организм GSH. Даже при 10-20-кратном увеличении терапевтической дозы препарата отмечено стабильное увеличение массы тела GSH, как на 16 день на 2,7% (№5) – 12,2% (№1), так на 21 день 1,8% (№4) – 25,2% (№3) по сравнению с исходным.

Таблица 3 – Оценка токсичности ИФ *in vivo* на GSH

| № GSH и разведение ИФ | Количество препарата на 100 г массы GSH (г)* | Количество вещества, введенного в/м (г) | Масса GSH (г) |              |              |
|-----------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                       |                                              |                                         | 1 день        | 16 день      | 21 день      |
| №1 в 10 раз           | 101000                                       | 91000                                   | 90            | 101 (+12,2%) | 107 (+18,9%) |
| №2 в 10 раз           | 101000                                       | 93000                                   | 92            | 101 (+9,8%)  | 120 (+30,4%) |
| №3 в 20 раз           | 188000                                       | 194000                                  | 103           | 114 (+10,7%) | 129 (+25,2%) |
| №4 в 20 раз           | 195000                                       | 219000                                  | 112           | 112 (0%)     | 114 (+1,8%)  |
| №5 в 20 раз           | 197000                                       | 221000                                  | 112           | 115 (+2,7%)  | 118 (+5,4%)  |

\*рекомендованное инструкцией количество препарата в пересчете на 100 г веса лабораторной модели, увеличенные в 10 и 20 раз.

**Исследование эффективности препаратов для терапии ЗКЛ *in vivo*.** Первая серия опытов посвящена изучению эффективности антибиотиков доксициклина, цефотаксима и цефтриаксона, а также МА и ИФ в виде монотерапии; вторая – сравнению монотерапии МА и

комбинированной терапии, включающей МА + ИФ; третья – изучению эффективности комбинированной терапии доксициклином в сочетании с ИФ.

Заражение животных в эксперименте *in vivo* выполняли на животных 2-х месячного возраста, масса которых была около 30 г. Клинические проявления заболевания возникали значительно позже, когда масса животных увеличивалась до 100 г. и более. Эти животные участвовали в эксперименте по оценке эффективности выбранных нами антилейшманиальных препаратов. В каждой группе при монотерапии было по 30 животных. Во второй и третьей сериях опытов, проведенных дважды, использовали лабораторные модели по 12 разнополых GSH в каждой группе (всего по 24 животных). Формирование опытных групп проводили с учетом массы тела животного, однозначности клинических проявлений и длительности существования язвы, что свидетельствует о репрезентативности групп. Для стандартизации опытов использовали руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н.и соавт., 2012]. В качестве возбудителя заболевания использовали промастиготы *L. major*. Заражение животных промастиготами более близко к естественному, так как оно подобно укусу переносчика.

*Методика оценки эффективности испытуемых лекарственных препаратов.* Их введение осуществляли на разных стадиях развития инфекции (лечебное исследование). Лечение GSH начинали после завершения инкубационного периода и трансформации большинства бугорков в язву, обычно спустя месяц и более с момента заражения. Эффективность терапии оценивалась с использованием следующих критериев: 1) динамика кожного процесса; 2) размер лейшманиомы; 3) наличие лейшманий в язве; 4) срок клинического выздоровления. Основным критерием отбора животных для начала терапии была клиническая картина лейшманиоза с ярко выраженным кожным процессом, подтвержденным микроскопически – обнаружением амастигот в мазке из очагов поражения.

**Клиническая характеристика особенностей течения ЗКЛ при использовании GSH в качестве лабораторной модели в эксперименте *in vivo*.** Инкубационный период при экспериментальном ЗКЛ у GSH колебался от 1 до 8 мес., в среднем  $76,8 \pm 21,8$  дня. Более чем у половины животных (58,1%) клинические проявления ЗКЛ возникали в течение 2 мес. с момента заражения, у остальных (41,9%) – спустя 2 мес., из них у 1/3 (30,8%) – через 3 мес. Первоначально на месте введения биомассы *L. major* появлялся блестящий бугорок плотной консистенции. В центре его через 5–7 дней возникала язва диаметром 1–2 мм. В дальнейшем она увеличивалась в размере. Сначала язвы в подавляющем большинстве случаев были размером до 4 мм, округлой формы. Имели валикообразно приподнятый край и обширную зону инфильтрата в основании. Со временем размер язв увеличивался до 1 см в диаметре (61,3%), иногда до 2 см (38,7%). По мере некротизации язвы ее дно обильно покрывалось гнойным

налетом, и отделялся гнойный экссудат. У трети (52 или 34,7%) GSH от язв исходил неприятный запах. Нередко экссудат ссыхался в корки, плотно прилегающие к краям язвы. При надавливании на корку по краям язвы выступала серозная жидкость, содержащая большое количество лейшманий. При локализации язв в области паха у животных возникал лимфостаз половых органов (7,6%), что приводило к нарушению передвижения животного. При локализации язвы на ушных раковинах всегда наблюдалось частичное или полное расплавление хрящевой ткани. Для верификации диагноза скарификаты делали с валикообразного края язвы. Лейшмании в большом числе обнаруживались и в серозной жидкости, получаемой при надавливании на корку. Большое число расположенных в макрофагах и свободно лежащих лейшманий свидетельствовало о наличии специфического процесса. При микроскопическом обнаружении лейшманий в очагах поражения животные включались с экспериментальный раздел работы для изучения противолейшманиальной активности препаратов. Сроки наблюдения за животными после введения препаратов составляли 60 дней.

**Результаты оценки эффективности лечения МА (контрольная группа) экспериментального ЗКЛ у GSH.** Препарат вводили 1 раз в нед. в дозе 0,03 г на 100 г массы лабораторной модели. Кратность введения препарата зависела от его переносимости. Максимальное число инъекций зависело от результатов клинического выздоровления и составляло 6-7, масса GSH в данной серии опытов составила  $107,8 \pm 1,7$  г. GSH выздоравливали в течение 2 мес, в среднем за  $40,7 \pm 3,2$  дня. На 30-ый день после начала введения МА снижения массы тела животных не зарегистрировано, средняя прибавка массы тела составила  $1,5 \pm 0,5$  г ( $p > 0,05$ ). Рубцевание язв наступило у 6 (20%) животных, у остальных 24 (80%) средний размер площади язв уменьшился в 10 раз ( $0,06 \text{ см}^2$  против  $0,6 \text{ см}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Степень местного поражения уменьшилась в 2,7 раза ( $1,2 \pm 0,7$  против  $3,2 \pm 0,7$ ) ( $p < 0,05$ ), а число лейшманий в очагах поражения – в 2,3 раза ( $1,5 \pm 0,5$  против  $3,5 \pm 0,4$ ) ( $p < 0,05$ ). На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составил  $5,0 \pm 1,1$  г. Степень местного поражения уменьшилась в 32 раза ( $0,1 \pm 0,03$  против  $3,2 \pm 0,7$ ) ( $p < 0,05$ ). Рубцевание язв наступило у всех GSH при сохранении лишь небольшой инфильтрации.

Таблица 4 – Оценка эффективности монотерапии МА ЗКЛ у GSH (N=30)

| Дни наблюдения                        | Масса лабораторной модели (г)    | Средний размер язв ( $\text{см}^2$ ) | Степень местного поражения (0/+) | Микроскопия/число лейшманий (0/+) * |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| До начала лечения                     | $107,8 \pm 1,7$                  | 0,6                                  | $3,2 \pm 0,7$                    | $3,5 \pm 0,4$                       |
| 30-ый день                            | $109,3 \pm 1,6$                  | 0,06                                 | $1,2 \pm 0,7$                    | $1,5 \pm 0,5$                       |
| 60-ый день                            | $112,8 \pm 1,6$                  | 0                                    | $0,1 \pm 0,03$                   | $0,6 \pm 0,6$                       |
| Срок клинического выздоровления (дни) | <b><math>40,7 \pm 3,2</math></b> |                                      |                                  |                                     |

\*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.



Микроскопически в очагах поражения обнаружено в среднем  $0,6 \pm 0,6$  лейшманий в мазке. Учитывая, что животные, пролеченные МА являются группой контроля, то при сравнении с опытными группами нами использованы показатели: степень местного поражения через 30 дней ( $1,2 \pm 0,7$ ) и через 60 дней ( $0,1 \pm 0,03$ ).

**Результаты оценки эффективности лечения доксициклином экспериментального ЗКЛ у GSH.** Препарат вводили 1 раз в нед. в дозе 0,00033 г. на 100 г. массы лабораторной модели. Максимальное число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало №4-5. Средняя масса GSH в данной серии опытов составила  $103,3 \pm 2,3$  г. Смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление животных происходило в течение месяца, в среднем за  $20,1 \pm 2,3$  дня (табл. 4), что достоверно в 2 раза быстрее, чем в контрольной группе (МА  $40,7 \pm 3,2$  дня) ( $p < 0,05$ ).

Таблица 5 – Оценки эффективности монотерапии доксициклином ЗКЛ у GSH (N=30)

| Дни наблюдения                        | Масса лабораторной модели (г)    | Средний размер язв ( $\text{см}^2$ ) | Степень местного поражения (0/+) | Микроскопия/ число лейшманий (0/+) * |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| До начала лечения                     | $103,3 \pm 2,3$                  | 0,44                                 | $3,1 \pm 0,8$                    | $3,7 \pm 0,3$                        |
| 30-ый день                            | $109,1 \pm 1,6$                  | 0                                    | $1,07 \pm 0,7$                   | $1,27 \pm 0,45$                      |
| 60-ый день                            | $113,3 \pm 1,4$                  | 0                                    | $0,07 \pm 0,01$                  | $0,03 \pm 0,01$                      |
| Срок клинического выздоровления (дни) | <b><math>20,1 \pm 2,3</math></b> |                                      |                                  |                                      |

\*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

Животные переносили лечение без побочных реакций. На 30-ый день эксперимента средняя прибавка массы тела GSH составила  $5,8 \pm 3,2$  г. Все язвы зарубцевались в течение 3 нед. Поэтому средний размер язвы равнялся 0 см. Степень местного поражения была  $1,07 \pm 0,7$  и кожные проявления были представлены лишь небольшой инфильтрацией. Сравнение степени местного поражения в данной опытной группе с контролем отличалось всего на 0,13, но животных с сохранившимися язвами не было. Результаты микроскопического исследования показали  $1,27 \pm 0,45$  лейшманий в мазке из очага поражения. Это в 2,9 меньше, чем до начала терапии ( $3,7 \pm 0,3$ ) ( $p < 0,05$ ) и на 0,23 меньше, чем при лечении МА ( $1,5 \pm 0,5$ ) ( $p > 0,05$ ).

Существенно, что на 60-ый день эксперимента по сравнению с его началом, животные прибавили в весе, в среднем на  $10,0 \pm 3,0$  г. Степень местного поражения была минимальной –  $0,07 \pm 0,01$  (контроль  $0,1 \pm 0,03$ ). Результаты микроскопического исследования –  $0,03 \pm 0,01$  лейшманий в мазке из очага поражения. Это в 20 раз меньше, чем в контроле ( $0,6 \pm 0,6$ ) ( $p < 0,05$ ). По всем критериям доксициклин более эффективен, чем МА. Разрешение язвенного процесса на коже наступило в 2 раза быстрее ( $40,7 \pm 3,2$  против  $20,1 \pm 2,3$ ) ( $p < 0,05$ ), при показателях степени местного поражения ( $0,1 \pm 0,03$  и  $0,07 \pm 0,001$ ) ( $p < 0,05$ ) и результатах микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения ( $0,6 \pm 0,6$  и  $0,03 \pm 0,01$ ) ( $p < 0,05$ ).

**Результаты оценки эффективности лечения цефтриаксоном экспериментального ЗКЛ у GSH.** Препарат вводили 1 раз в нед. в дозе 0,00343 г на 100 г массы лабораторной модели. Максимальное число инъекций, учитывая гибель животных, не превышало №3. Средняя масса GSH составила  $106,6 \pm 1,44$  г. Средний размер язв до начала терапии –  $0,47 \text{ см}^2$ . При лечении цефтриаксоном у GSH наблюдалось резкое снижение массы, сопровождаемое снижением активности животных, апатией, потерей аппетита, жидким стулом, воспалительными изменениями конъюнктивы, скорее всего бактериальной этиологии. За 30 дней масса тела животных уменьшилась в 1,8 раза ( $58,5 \pm 3,1$  против  $106,6 \pm 1,4$  г) ( $p < 0,05$ ). Средний размер язвы, наоборот, увеличился в 2,2 раза ( $1,05$  против  $0,47$ ) ( $p < 0,05$ ). Степень местного поражения достоверно не изменилась и составила  $2,83 \pm 0,75$  ( $p > 0,05$ ). Результаты микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения ( $2,77 \pm 0,73$ ) несколько снизились ( $p < 0,05$ ), что возможно обусловлено специфическим действием препарата. Все животные погибли к концу первого – началу второго месяца. Это согласуется с полученными ранее данными и высокой токсичности препарата. Несмотря на эффективность цефтриаксона *in vitro*, по данным токсикологического исследования и *in vivo*, его возможное применение исключено.

**Результаты оценки эффективности лечения экспериментального ЗКЛ у GSH цефотаксимом.** Препарат вводили 1 раз в нед. в терапевтической дозе 0,012 г. на 100 г. массы лабораторной модели. Максимальное число инъекций не превышало №3. Средняя масса GSH до начала терапии была  $116,1 \pm 2,5$  г. Средний размер язв до начала терапии составлял  $0,42 \text{ см}^2$ . При лечении цефотаксимом зарегистрирована смертность всех GSH к концу четвертой – началу пятой нед. У животных наблюдалось нарастание кахексии, снижение активности животных, апатия, потеря аппетита, жидкий стул, более выраженные острые воспалительные изменения конъюнктивы, чем при использовании цефтриаксона. За 30 дней масса тела животных уменьшилась в 1,6 раза ( $75,1 \pm 4,39$  против  $116,1 \pm 2,5$  г) ( $p < 0,05$ ). Средний размер язвы, наоборот, увеличился в 2,5 раза ( $1,03 \text{ см}^2$  против  $0,42 \text{ см}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Степень местного поражения достоверно не изменилась и составила  $3,07 \pm 0,7$  ( $p > 0,05$ ). Результаты микроскопического исследования лейшманий в мазке из очага поражения показали небольшое снижение данного показателя ( $3,13 \pm 0,7$ ) ( $p > 0,05$ ). При использовании цефотаксима для лечения GSH с ЗКЛ наступает их гибель. Это согласуется с полученными ранее данными о высокой токсичности препарата и его недостаточной эффективности в эксперименте *in vitro*.

**Результаты оценки эффективности лечения ИФ экспериментального ЗКЛ у GSH.** Препарат вводили 1 раз в нед. в дозе 164.410 МЕ на 100 г. массы лабораторной модели. Максимальное число инъекций, учитывая быструю положительную динамику кожного процесса, не превышало №4-5. Средняя масса GSH до начала терапии составила  $109,5 \pm 1,9$  г.

Средний размер язв до начала терапии –  $0,49\text{см}^2$ . При лечении ИФ смертности животных не зарегистрировано. Выздоровление GSH происходило в течение мес., в среднем за  $27,2\pm 3,8$ . С начала лечения животные переносили его без побочных реакций. На 30-ый день средняя прибавка массы тела составил  $16,7\pm 4,2$  г., Степень местного поражения уменьшилась в 3 раза ( $1,07\pm 0,74$  против  $3,2\pm 0,6$ ) ( $p<0,05$ ) и кожные проявления были представлены лишь выраженной инфильтрацией на месте язвы, поэтому средний размер язвы равнялся  $0\text{ см}^2$ . Результаты микроскопического исследования показали снижение инфицированности очага в 2,9 раза ( $1,27\pm 0,45$  против  $3,6\pm 0,4$ ) ( $p<0,05$ ). На 60-ый день средняя прибавка массы тела составила 25%. Степень местного поражения уменьшилась в 18,8 раз ( $0,17\pm 0,08$  против  $3,2\pm 0,6$ ) ( $p<0,05$ ), а показатель инфицированности очага лейшманиями – в 3,2 раза ( $1,17\pm 0,38$  против  $3,7\pm 0,4$ ).

**Результаты оценки эффективности комбинированного лечения МА и ИФ экспериментального ЗКЛ у GSH.** Использованы 24 GSH. Препарат вводили 1 раз в нед. в дозе  $0,03\text{ г} + 155\ 356\text{ ME}$  на  $100\text{ г.}$  массы лабораторной модели. Максимальное число инъекций не превышало №4-5. Средняя масса GSH составила  $110,5\pm 3,6$  г, средний размер язв –  $0,47\text{см}^2$ . Смертности животных не зарегистрировано. Их выздоровление происходило в течение мес., в среднем за  $22,1\pm 1,2$  дня. GSH переносили лечение без каких-либо побочных реакций. На 30-ый день средняя прибавка массы тела составил  $25,5\pm 4,9$  г. Учитывая, что все язвы зарубцевались в течение 4 нед., средний размер язвы равнялся  $0\text{ см}^2$ . Степень местного поражения уменьшилась в 7 раз ( $0,46\pm 0,5$  против  $3,2\pm 0,8$ ) ( $p<0,05$ ) и кожные проявления были представлены в 45,8% случаев лишь инфильтрацией на месте язвы. Результаты микроскопического исследования свидетельствовали о снижении инфицированности очага в 2,9 раза ( $1,3\pm 0,46$  против  $3,7\pm 0,3$ ) ( $p<0,05$ ). На 60-ый день средняя прибавка массы тела составила 23,2% ( $25,6\pm 3,8$  г). Степень местного поражения равнялась  $0\text{ см}^2$ , а показатель инфицированности очага поражения лейшманиями улучшился на 97,6% или в 41,1 раза ( $0,09\pm 0,03$  против  $3,7\pm 0,3$ ) ( $p<0,05$ ).

Таким образом, сроки разрешения клинических проявлений на коже при комбинированной терапии МА + ИФ были на 3 нед. или в 1,8 раза меньше, чем при использовании монотерапии МА ( $22,1\pm 1,2$  дня против  $40,7\pm 3,2$ ) ( $p<0,05$ ). Прибавка массы тела животных на 30 день эксперимента при комбинированной терапии была в 16,5 раз больше, чем при монотерапии (23,1% против 1,4%) ( $p<0,05$ ), степень местного поражения – в 2,6 раза меньше ( $0,46\pm 0,5$  против  $1,2\pm 0,7$ ), а результаты микроскопического исследования лейшманий в мазках из очага поражения – практически идентичными ( $1,3\pm 0,46$  и  $1,5\pm 0,5$ , соответственно). На 60 день при полном рубцевании язв у животных при комбинированной терапии в сравнении с монотерапией показатель инфицированности очага поражения лейшманиями был в 6,7 раза меньше ( $0,09\pm 0,03$  против  $0,6\pm 0,6$ ) ( $p<0,05$ ).

## Результаты оценки эффективности комбинированного лечения доксициклином + ИФ экспериментального ЗКЛ у GSH.

Таблица 6 – Оценки эффективности комбинированной терапии доксициклином + ИФ ЗКЛ у GSH

| Дни наблюдения                        | Масса лабораторной модели (г) | Средний размер язв (см <sup>2</sup> ) | Степень местного поражения (0/+) | Микроскопия/ число лейшманий (0/+) |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| До начала лечения                     | 103,3±1,1                     | 0,46                                  | 3,1±0,7                          | 3,6±0,4                            |
| 30-ый день                            | 134,8±1,3                     | 0                                     | 0,042±0,02                       | 0,9±0,3                            |
| 60-ый день                            | 135,1±1,3                     | 0                                     | 0                                | 0,04±0,01*                         |
| Срок клинического выздоровления (дни) | <b>19,2±0,9</b>               |                                       |                                  |                                    |

\*следует учитывать, что факт наличия паразита в мазках не отражает жизнеспособность возбудителя.

Проведено 2 серии опытов с интервалом 2 месяца. В каждой серии опытов задействовано по 12 GSH. Препараты вводили 1 раз в нед. одновременно разными шприцами внутримышечно в симметричные участки тела (бедро). Доза доксициклина составляла 0,0003 г. на 100 г массы GSH, а доза ИФ – 156146 МЕ. Максимальное число инъекций не превышало №3-4. Средняя масса GSH составила 103,3±1,1 г, средний размер язв – 0,46см<sup>2</sup>. Смертности животных не зарегистрировано. Их выздоровление происходило в течение мес., в среднем за 19,2±0,9 дня. С самого начала животные переносили лечение без побочных реакций. На 30-ый день средняя прибавка массы тела составил 31,5±1,3 г. Все язвы зарубцевались в течение 3 нед, а средний размер язвы равнялся 0 см<sup>2</sup>. Степень местного поражения уменьшилась в 74 раза (3,1±0,7 против 0,042±0,02) (p<0,05) и кожные проявления были представлены лишь небольшой инфильтрацией на месте язвы (у одного животного), т.е. происходило их активное рубцевание. Результаты микроскопического исследования показали снижение инфицированности очага поражения в 4 раза (3,6±0,4 против 0,9±0,3) (p<0,05). На 60-ый день по сравнению с началом эксперимента средняя прибавка массы тела составила 30,8% (31,8±1,9 г). Степень местного поражения равнялась 0, а показатель инфицированности очага поражения лейшманиями улучшился на 98,9% (3,6±0,4 против 0,04±0,01).

Сроки разрешения клинических проявлений на коже при использовании комбинированной терапии были идентичными монотерапии доксициклином (19,2±0,9 дня и 20,1±2,3) (p>0,05). Однако прибавка массы тела животных на 30 день эксперимента была в 5,5 раза больше, чем при монотерапии (30,8% против 5,6%) (p<0,05), степень местного поражения – в 25,5 раз меньше (0,042±0,02 против 1,07±0,7) (p<0,05), а результаты микроскопического исследования лейшманий в мазках из очага поражения – в 1,4 раза лучше (0,9±0,3 против 1,27±0,45, соответственно). На 60 день при полном рубцевании язв у животных при комбинированной терапии и монотерапии в мазках лейшманий отсутствовали. Сравнительный анализ эффективности препаратов и методов лечения экспериментального ЗКЛ GSH (табл. 7).

Таблица 7 – Показатели эффективности противолейшманиальных препаратов в эксперименте *in vivo* на GSH: меглума антимоноат (МА), доксициклин (ДЦ), интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным (ИФ) и их комбинаций меглума антимоноат + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (МА + ИФ), доксициклин + интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный (ДЦ + ИФ)

| Показатели                                           | МА              | ДЦ              | ИФ              | МА + ИФ         | ДЦ + ИФ         |
|------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Показатели до начала терапии                         |                 |                 |                 |                 |                 |
| Масса лабораторной модели (г.)                       | 107,8±1,7       | 103,3±2,3       | 109,5±1,9       | 110,5±3,6       | 103,3±1,1       |
| Средний размер язв (см <sup>2</sup> )                | 0,6             | 0,44            | 0,49            | 0,47            | 0,46            |
| Степень местного поражения (0/+)                     | 3,2±0,7         | 3,1±0,8         | 3,2±0,6         | 3,2±0,8         | 3,1±0,7         |
| Микроскопия/число лейшманий (0/+)                    | 3,5±0,4         | 3,7±0,3         | 3,6±0,4         | 3,7±0,3         | 3,6±0,4         |
| Показатели через 30 дней после начала терапии        |                 |                 |                 |                 |                 |
| Масса лабораторной модели (г.)                       | 109,3±1,6       | 109,1±1,6       | 126,2±4,5       | 136,0±3,4       | 134,8±1,3       |
| Средний размер язв (см <sup>2</sup> )                | 0,06            | 0               | 0               | 0               | 0               |
| Степень местного поражения (0/+)                     | 1,2±0,7         | 1,07±0,70       | 1,07±0,74       | 0,46±0,5        | 0,042±0,02      |
| Микроскопия/число лейшманий (0/+)                    | 1,5±0,5         | 1,27±0,45       | 1,27±0,45       | 1,3±0,46        | 0,9±0,3         |
| Показатели через 60 дней после начала терапии        |                 |                 |                 |                 |                 |
| Масса лабораторной модели (г.)                       | 112,8±1,6       | 113,3±1,4       | 136,9±4,3       | 136,1±1,7       | 135,1±1,3       |
| Средний размер язв (см <sup>2</sup> )                | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| Степень местного поражения (0/+)                     | 0,1±0,03        | 0,07±0,01       | 0,17±0,08       | 0               | 0               |
| Микроскопия/число лейшманий (0/+)                    | 0,6±0,6         | 0,03±0,01       | 1,17±0,38       | 0,09±0,03       | 0,04±0,01       |
| <b>Средний срок клинического выздоровления (дни)</b> | <b>40,7±3,2</b> | <b>20,1±2,3</b> | <b>27,2±3,8</b> | <b>22,1±1,2</b> | <b>19,2±0,9</b> |

Средняя прибавка массы тела GSH была минимальной при монотерапии МА (1,4%) и максимальной – при комплексной терапии доксициклином + ИФ (30,5%). Значительная прибавка наблюдалась и при комплексной терапии МА + ИФ (23,1%).

При сравнение средних сроков клинического выздоровления GSH максимальный срок отмечен при монотерапии МА ( $40,7 \pm 3,2$  дня). При других видах терапии он был значительно меньше. При монотерапии ИФ срок ( $27,2 \pm 3,8$ ) был достоверно больше, чем при монотерапии доксициклином ( $20,1 \pm 2,3$ ) и при обоих видах комбинированной терапии ( $22,1 \pm 1,2$  и  $19,2 \pm 0,9$ ).

Полученные данные с определенной долей вероятности свидетельствуют о синергизме специфического действия доксициклина, МА и ИФ. Уменьшение сроков клинического выздоровления при комбинированной терапии МА +ИФ по сравнению с монотерапией в 1,8 раза ( $40,7 \pm 3,2$  против  $22,1 \pm 1,2$ ) возможно обусловлено также снижением токсичности МА.

Сравнение средних степеней местного поражения на коже через 30 дней после начала терапии свидетельствовало, что только при лечении МА рубцевание язв наступило всего у 20% животных. При этом у остальных GSH средний размер язв уменьшился в 10 раз.

Средняя степень местного поражения свидетельствует о значительном преимуществе обоих видов комбинированной терапии. Наименьшая была при сочетании доксициклина с ИФ ( $0,04 \pm 0,02$ ). При использовании терапии МА + ИФ этот показатель был в 10 раз больше ( $0,46 \pm 0,5$  против  $0,04 \pm 0,02$ ). При всех видах монотерапии он мало отличался между собой. Элиминация возбудителя из очага поражения через 30 дней после начала терапии наступала достоверно интенсивнее при использовании комбинированной терапии доксициклином + ИФ ( $0,9 \pm 0,3$ ) ( $p < 0,05$ ). При остальных видах терапии достоверные отличия отсутствовали.

Спустя 60 дней после начала терапии лейшмании в очагах поражения отсутствовали при использовании обоих методов комбинированной терапии ( $0,09 \pm 0,03$  и  $0,04 \pm 0,01$ ). При лечении ИФ в виде монотерапии возбудитель в очагах поражения сохранялся в большем числе ( $1,17 \pm 0,38$ ). Это является прямым доказательством о его незначительном специфическом действии.

## ВЫВОДЫ

1. Инкубационный период экспериментального ЗКЛ у GSH колеблется от 1 до 8 мес., составляя в среднем  $76,8 \pm 21,8$  дня. У 58,1% животных клинические проявления ЗКЛ возникают в течение 2 мес., у 41,9% – спустя 2 мес., в том числе у 30,8% – через 3 мес. Размер язв до 1 см в диаметре зарегистрирован в 61,3% случаев, до 1,5 см – в 38,7%. Лимфостаз в области половых органов (7,6%) наблюдается редко. При локализации язв на ушных раковинах наблюдается частичное или полное расплавление хрящевой ткани.

2. Сравнительная оценка *in vitro* трех антибиотиков (доксициклина, цефотаксима, цефтриаксона) на промастиготы лейшманий с учетом их *min* доз, количества протистов в поле

зрения и показателя инактивации их подвижности свидетельствует о лидировании доксициклина и цефтриаксона. *Min* дозы обоих препаратов приводят к абсолютному подавлению подвижности возбудителя. Хотя специфическая активность доксициклина при количественном измерении числа промастигот в 2,6 раза ниже, чем у цефтриаксона (2,250 и 5,083, соответственно), но *min* терапевтическая доза доксициклина в 15 раз меньше, чем у цефтриаксона (0,0006 г против 0,009 г, соответственно). Повышение терапевтической дозы препаратов не обосновано. Сравнение этих препаратов с меглума антимонатом показало их превосходство по всем показателям.

3. Доксициклин, меглума антимоната и интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный при экспериментальном изучении их токсичности *in vivo* на GSH не обладают таковой при увеличении терапевтической дозы препарата в несколько раз. Выраженной токсичностью обладают оба препарата из группы цефалоспоринов III поколения – цефотаксим и цефтриаксон.

4. *In vivo* цефтриаксон и цефотаксим в терапевтической дозе вызывают гибель лабораторных животных. Монотерапия меглума антимонатом, доксициклином и интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным достаточно эффективна и не различается к 30 дню их применения по таким показателям как средняя степень местного поражения ( $1,20 \pm 0,70$ ;  $1,07 \pm 0,70$  и  $1,07 \pm 0,74$ , соответственно) и среднему числу лейшманий в очаге поражения ( $1,50 \pm 0,50$ ;  $1,27 \pm 0,45$  и  $1,27 \pm 0,45$ , соответственно). Отличия зарегистрированы в показателях средней прибавки массы тела (максимальная при лечении интерфероном – 15,3%), средних сроках клинического выздоровления (минимальный при лечении доксициклином –  $20,1 \pm 2,3$  дня). Лейшмании в очаге поражения на 60 день полностью отсутствовали при лечении доксициклином.

5. Комплексная терапия экспериментального ЗКЛ у GSH по данным *in vivo* позволила повысить эффективность меглума антимоната и доксициклина за счет интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного по всем показателем в сравнении с монотерапией.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Оценка специфической активности доксициклина в эксперименте *in vitro* и *in vivo* обосновывает целесообразность расширения показаний для данного препарата, в частности, для использования при кожном лейшманиозе.

В официальных инструкциях препаратов, рекомендованных Национальным руководством для использования в РФ, отсутствуют показания для их применения при кожном лейшманиозе. Исследования по изучению специфической антилейшманиальной активности доксициклина, повышении терапевтической эффективности данного препарата и меглума антимоната могут

быть использованы для решения вопроса о расширении клинических показаний для их использования.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кузнецова, Ю.К. Новое топическое средство для лечения кожного лейшманиоза / Коваленко Ф.П., Понировский Е.Н. // Российская научно-практическая конференция с международным участием «Междисциплинарные аспекты дерматовенерологии, косметологии и эстетической гинекологии». – Москва. – 2013. – С.116-118.
2. Кузнецова, Ю.К. Кожный лейшманиоз / Коваленко Ф.П., Понировский Е.Н., Кузнецова К.Ю. // Юбилейный сборник статей к 30-летию поликлиники. Част 2. Под редакцией Е.Б.Александровой. – Москва. – 2014 г. – С.36-38.
3. Кузнецова, Ю.К. Клинический случай кожного лейшманиоза / Сирмайс Н.С. // VIII Российская научно-практическая конференция «Санкт-Петербургские дерматологические чтения 2014». С.-Пб. – 2014. – С.15-16.
4. Кузнецова, Ю.К. Проблема лечения лейшманиозов в РФ/ Стрелкова М.В. // Научно-практическая конференция «Нерешенные вопросы этиотропной терапии актуальных инфекций». – С.-П. – 2014. – С.58-59.
5. Кузнецова, Ю.К. Руководство по клинике и диагностике лейшманиозов / Понировский Е.Н., Стрелкова М.В., Завойкин В.Д., Жиренкина Е.Н. Москва – 2015 г.
6. Кузнецова, Ю.К. Исторические аспекты лечения кожного лейшманиоза / Джаншун Янг // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2017. – №1. – С. 33-35.
7. **Кузнецова, Ю.К.** Сравнительные данные противолейшманиальной активности антибактериальных препаратов отечественного производства, полученные в экспериментальных исследованиях *in vitro* // **Здоровье населения и среда обитания.** – 2017. – №1. – С. 50-52
8. Кузнецова, Ю.К. Сравнительная оценка специфической активности препаратов для лечения зоонозного кожного лейшманиоза *in vitro*. // Дерматология в России. – 2017. –№ S1. –С. 117-118.
9. Kuznetsova, Yu.K. Treatment for cutaneous leishmaniasis: Historical aspects/ Sergiev V.P., Kuznetsova K.Yu. // Antibiotics and chemotherapy. – 2017. – № 3-4. – P. 53-57.
10. Кузнецова, Ю.К. Оценка токсичности препаратов с противолейшманиальным эффектом, доказанным *in vitro*. // Сборник тезисов XXXV научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: Перспективные направления диагностики и терапии в дерматовенерологии и косметологии». – М. –2018. – С. 54-55.
11. Кузнецова, Ю.К. Кожный лейшманиоз: причины резистентности терапии. // Проблемы медицинской микологии. – 2018. –Том 20. – № 2. – С. 84.
12. **Кузнецова, Ю.К.** Исследование эффективности препаратов для терапии зоонозного кожного лейшманиоза *in vivo* на лабораторной модели. // **Антибиотики и химиотерапия.** – 2018. – Т. 63. – № 7-8. – С. 7-13.

### Список сокращений

|             |                                                 |            |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------|
| <b>ВЛ</b>   | Висцеральный лейшманиоз                         | <b>ИФ</b>  | Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный |
| <b>ДЦ</b>   | Доксициклин                                     | <b>КЛ</b>  | Кожный лейшманиоз                               |
| <b>ЗКЛ</b>  | Зоонозный кожный лейшманиоз                     | <b>МА</b>  | Меглумина антимонат                             |
| <b>GSH</b>  | Золотистые хомяки – Golden Syrian hamster (GSH) | <b>LRV</b> | Лейшманиальный РНК-вирус                        |
| <b>ГРЛС</b> | Государственный реестр лекарственных средств    |            |                                                 |