

Лечение Туберкулёза маслом Чёрного Тмина мягких арабских сортов

Отчёт об исследованиях проводимых ФГБНУ ЦНИИ Туберкулёза (Центральный научно-исследовательский институт Туберкулёза, 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2, проезд 1) по заказу и для международной группы компаний «Arabian Secrets».



г. Москва – 2007 год

Исследования проводило в течение всего 2007 года старейшее российское государственное противотуберкулёзное учреждение (действует с 1921 года) известное в РФ и за рубежом своими фундаментальными исследованиями в области иммунологии, микробиологии и патологии Туберкулёза.

В качестве объекта исследования нами было предоставлено масло чёрного тмина первого холодного отжима полученное из семян одного из нежных мягких исключительно арабских сортов Чёрного Тмина.

На данный момент нашими компаниями выпускается данное масло для профилактики и лечения Туберкулёза в следующих формах:

ЛУЧШЕЕ МАСЛО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА

WWW.ARABIANSECRETS.RU



«СИРИЙСКОЕ НЕФИЛЬТРОВАННОЕ»

«ЕГИПЕТСКОЕ НЕФИЛЬТРОВАННОЕ»

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ГУ ЦНИИТ РАМН
Заслуженный деятель науки РФ
Член-корреспондент РАМН
Профессор В. В. Ерохин



2007г.

ОТЧЕТ

К договору № 10-и от 01 марта 2007 г.

Изучение специфической активности биологически активной добавки (БАД) - «масло черного тмина» - на модели экспериментального туберкулеза у мышей.

МОСКВА 2007

Цель исследования: изучение специфической активности биологически активной добавки (БАД) - «масло черного тмина» - на модели экспериментального туберкулеза у мышей.

Для выполнения поставленной цели определены следующие задачи:

1. Определить показатель выживаемости животных после заражения смертельной дозой МБТ в различных экспериментальных группах животных.
2. Изучить микробиологическими методами *in vivo* и *in vitro* бактерицидную и бактериостатическую активность исследуемых препаратов.
3. Изучить морфологическими методами характер репаративных процессов в паренхиматозных органах в процессе лечения экспериментального туберкулеза мышей исследуемых групп.

Материалы и методы исследования

Определение специфической активности "БАД" в системе *in vivo* проводили на самцах инбредных мышей линии C57BL/6, полученных из вивария ГУ ЦНИИТ РАМН. Вес мышей – 21-22 грамма. Мышей заражали внутривенным введением *M. tuberculosis* штамма H37Rv из коллекции института Пастера (Франция) в латеральную хвостовую вену в дозе 10^7 КОЕ. В препаративных количествах МБТ были получены в лаборатории иммуногенетики ГУ ЦНИИТ РАМН. Аликвоты (1мл) хранили при -70°C . Для определения количества КОЕ микобактерий в полученной суспензии отбирали аликвоту, готовили серию последовательных разведений и 20 мкл каждого разведения помещали в капле на чашку Петри с агаром Дюбо. Чашки культивировали при 37°C в течение 14 суток для определения концентрации МБ в инфицирующем материале. Для заражения мышей аликвоту размораживали, переводили в фосфатно-буферный раствор, содержащий 0,025% Твина 80 и доводили до концентрации 10^7 КОЕ/мл.

Все экспериментальные животные были разделены на следующие группы:

- 1 – зараженные животные, не получающие лечения (контроль дозы заражения);
- 2 – зараженные животные, получающие противотуберкулезный препарат изониазид в течение 1 месяца на следующий день после инфицирования в стандартной терапевтической дозе;
- 3 – зараженные животные, получающие противотуберкулезный препарат изониазид в стандартной терапевтической дозе и БАД в количестве 0,5 мл на мышшь в течение 1 месяца на следующий день после инфицирования;
- 4 – зараженные животные, получающие изониазид в стандартной терапевтической дозе и БАД в количестве 0,1 мл на мышшь в течение 1 месяца на следующий день после инфицирования;
- 5 – зараженные животные, получающие БАД в количестве 0,5 мл на мышшь в течение 1 месяца на следующий день после инфицирования;

Количество животных в каждой группе -15 голов.

Препараты вводили внутривенно, ежедневно, в течение 1 месяца, на следующий день после заражения. Через 1 месяц часть животных 2,3,4,5 групп выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации для микробиологических, иммунологических и морфологических исследований.

Для оценки эффективности исследуемого препарата от каждого животного брали кусочки легкого, печени и селезенки для гистологического и целый орган для микробиологического исследования.

Количество микобактерий в легких зараженных мышей определяли через 1 месяц после начала лечения. Легкие гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серию 10-кратных разведений исходной суспензии в физиологическом растворе и 50 мкл каждого разведения помещали на чашку Петри, покрытую агаром Дюбо. Чашки Петри с нанесенными суспензиями клеток легкого инкубировали в течение 18-20 дней при 37°C, после чего подсчитывали число колоний на чашке и определяли количество КОЕ микобактерий в легких по формуле: $N_{\text{КОЕ}} = 2N_1 \times P / 0.1$, где N – количество колоний в легких.

Для гистологического изучения кусочки легкого и печени фиксировали 10% забуференным формалином, заключали в парафин, готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуноферментный анализ проводили в 96-ти луночных планшетах с высокой связывающей способностью (Costar, США). Планшеты адсорбировали комплексным антигенным препаратом культурального фильтрата *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в концентрации 10 мкг/мл в течение 18 часов при 4°C. После отмывки PBS, содержащим 0,1% Tween 20, в планшеты вносили сыворотки исследуемых животных в разведениях 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400. После часовой инкубации и отмывки PBS-Tween в планшеты добавляли вторые антитела, меченые пероксидазой хрена. Иммунопероксидазные конъюгаты, направленные против поливалентных IgG (Sigma, США), подклассов IgG1, IgG2a (ICN, США), IgM и IgA мыши (Sigma, США). После инкубации в течение часа планшеты отмывали PBS-Tween 20 и в лунки вносили субстрат цветной реакции, содержащий цитратный буфер, перекись водорода и тетраметилбензидин. После инкубации в темноте в течение 15 минут реакцию останавливали 1M серной кислотой. Оптическую плотность считывали при 450 нм.

Каждое разведение рассчитывали как среднее по группе из 3-х животных с учетом ошибки среднего. Титры рассчитывали как разведение, при котором определяется минимальная реакция, а результаты представляли как среднее по группе с разбросом в ошибку среднего.

Определение пролиферативного ответа лимфоцитов проводили на популяции клеток селезенки. Отмытые в среде 199 (ИПВЭ РАМН) с добавлением 2% телячьей сыворотки, 10 мм HEPES, клетки ресуспендировали в полной питательной среде для культивирования лимфоцитов (RPMI – 1640). Полученные клетки вносили по 4 млн. в лунки 24-луночного планшета, в 1 мл питательной среды и вносили в подопытные лунки PPD из расчета 20 мкл/мл. Контролем служили лунки без антигена. Клетки культивировали при 37°C в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе с 5% CO₂, на последние 16 часов в лунки вносили 1 μl ³H – тимидина с удельной

активностью 5мг/моль. После культивирования клетки собирали с помощью харвестера на фильтры из стекловолокна, промывали 5% раствором трихлоруксусной кислоты, затем дистиллированной водой, высушивали и переносили во флаконы с 10мл толуольного сцинтиллятора. Подсчёт производили на сцинтилляционном счетчике БЭТА – 2. Все образцы тестировали в трех повторах и вычисляли среднее значение. Индекс пролиферации определяли отношением числа импульсов в минуту в пробе с антигеном к их числу в контрольной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными показателями резистентности животного к туберкулезу являются срок выживаемости после инфицирования, способность контролировать размножение микобактерий в органах (то есть количество микобактерий, измеряемое в КОЕ) и степень патологических изменений легочной ткани.

У мышей контрольной группы, не получавших никаких препаратов, выживаемость после смертельной дозы заражения составила $24,2 \pm 0,22$ дней. Мыши, получавшие только БАД в дозе 0,5 мл/мышь в течение 1 месяца после заражения, прожили $46,4 \pm 2,65$ дня, что в два раза больше, чем мыши контрольной группы, остальные животные на момент забоя были живы. Данные представлены в таблице 1.

*Выживаемость мышей после внутривенного заражения летальной дозой *M.tuberculosis* H37Rv 10^7 КОЕ*

Таблица 1

Группа животных	Среднее время выживаемости $X \pm SD$
Контрольные животные (гр.1)	$24,2 \pm 0,22$
БАД 0,5 мл/мышь (гр.5)	$46,4 \pm 2,65$

Результаты микробиологического исследования *in vivo* представлены в таблице 2.

Количество высеваемых *M.tuberculosis* H37Rv из легких мышей
Через 1 месяц после заражения в дозе 10^7 КОЕ

Таблица 2

Группа животных	КОЕ на легкое X±SD
Контрольные животные (1 группа)	$(5.9 \pm 3.3) \times 10^9$
Изониазид (2 группа)	$(4,3 \pm 3,1) \times 10^3$
Изониазид + БАД 0,5 мл/мышь (3 группа)	Не обнаружено
Изониазид + БАД 0,1 мл/мышь (4 группа)	Не обнаружено
БАД 0,5 мл/мышь (5 группа)	$(4,7 \pm 3,3) \times 10^7$

Как видно из приведенных данных, через 1 месяц после инфицирования у мышей, получавших только БАД в течение месяца, высевалось на 2 порядка ниже микобактерий, чем у мышей контрольной группы. У мышей, получавших БАД совместно с изониазидом, независимо от дозы БАД, микобактерий в легких обнаружено не было, что свидетельствует о бактериостатическом действии препарата.

Уровень антимиkobактериальных антител (оптическая плотность при 450 нм) у мышей, зараженных *M. tuberculosis* H37Rv через 1 месяц после инфицирования.

Таблица 3

ОП 450нм	Без лечения (контроль)		Изониазид		Изониазид и БАД(0,5)		Изониазид и БАД(0,1)		БАД(0,5)	
	М	м	М	м	М	м	М	м	М	м
IgG										
1 :100	0,167	0,058	0,092	0,016	0,093	0,026	0,196	0,037	0,088	0,041
1 : 400	0,094	0,036	0,038	0,010	0,032**	0,021	0,100	0,027	0,036	0,020
1 : 1600	0,044	0,017	0,013	0,003	0,011**	0,003	0,041**	0,015	0,009	0,005
1 : 6400	0,024	0,009	0,012	0,002	0,611**	0,478	0,015**	0,004	0,001	0,001
Титр	2228	1219	374	324	719	321	408	74	443	229
IgG1										
1 :100	0,047	0,010	0,046	0,006	0,047	0,008	0,036	0,010	0,011*	0,006
1 : 400	0,021	0,005	0,032	0,009	0,020	0,005	0,018	0,003	0,007	0,003
1 : 1600	0,005	0,002	0,012*	0,006	0,005	0,003	0,009	0,004	0,002**	0,000
1 : 6400	0,004	0,000	0,003	0,000	0,001	0,009	0,002*	0,000	0,001*	0,001
Титр	1078	173	2559	1063	545	236	1196	1184	978	471
IgG2a										
1 :100	0,166	0,011	0,184	0,014	0,123	0,036	0,057*	0,010	0,156	0,067
1 : 400	0,111	0,006	0,110	0,007	0,047	0,013	0,034*	0,011	0,049	0,012
1 : 1600	0,043	0,011	0,061	0,008	0,021	0,010	0,017**	0,010	0,014**	0,008
1 : 6400	0,015	0,004	0,014	0,001	1,032	0,812	0,005	0,004	0,007	0,001
Титр	3718	2081	1221	584	306	166	284	255	951	742
IgA										
1 :100	0,303	0,055	0,114**	0,006	0,088**	0,008	0,055*	0,007	0,070*	0,029
1 : 400	0,210	0,024	0,097**	0,008	0,069*	0,008	0,037*	0,006	0,048*	0,014
1 : 1600	0,179	0,027	0,090**	0,013	0,064*	0,015	0,015*	0,001	0,027*	0,009
1 : 6400	0,110	0,007	0,060**	0,010	0,029*	0,010	0,019*	0,007	0,063*	0,009
Титр	43203	28195	9503	6949	8437	2461	1895	913	4290	2164
IgM										
1 :100	0,475	0,110	0,267	0,088	0,562	0,079	0,528	0,133	0,362	0,370
1 : 400	0,261	0,100	0,167	0,074	0,330	0,087	0,311	0,117	0,148	0,158
1 : 1600	0,107	0,049	0,081	0,033	0,129	0,027	0,143	0,068	0,052	0,059
1 : 6400	0,040	0,012	0,034	0,010	0,171	0,106	0,035	0,026	0,016	0,015
Титр	1011	496	1348	586	1512	272	2441	2088	359	187

* - различия с контрольной группой достоверны $p < 0,001$;

** - различия с контрольной группой достоверны $p < 0,05$.

Как видно из приведенных данных, группы животных, получавших терапию изониазид и БАД и монотерапию БАД, имеют значительно меньшие значения уровней антимикобактериальных антител во всех исследуемых классах и самые высокие значения титров при изучении ответа по общим/поливалентным IgG и IgM антителам.

Такие же высокие уровни антител наблюдаются и при исследовании антительного ответа по подклассам IgG: IgG1, IgG2a, но уже не сопровождаются максимальными титрами, которые оказываются наибольшими в группах с проводившейся химиотерапией или при сочетании двух терапевтических подходов. Аналогичная картина наблюдается при исследовании IgA антител.

Ответ IgG2a антител имеет явно более выраженный характер как по avidности (уровень антител), так и по аффинности (показатели титров) в сравнении с ответом IgG1 антител.

При длительной химиотерапии также сохраняется повышенный уровень антител IgG и IgM классов. Аналогичный ответ наблюдается при протективном ответе на L-арабиноманнан, отражающем уровень его экспрессии самой микобактерией и напрямую зависит от числа возбудителя в органах хозяина.

Индекс пролиферации Т-лимфоцитов селезенки мышей , инфицированных
M.tuberculosis H37Rv
 Через 21 день после заражения в дозе 10^7 КОЕ

Таблица 4

Группа животных	M+ m
Контроль – 1 группа	0,19± 0,031
Изониазид – 2 группа	0,26±0,027
Изониазид + БАД 0,5 мл – 3 группа	0,54±0,034
Изониазид + БАД 0,1 мл – 4 группа	0,63±0,021
БАД 0,5 мл – 5 группа	0,31±0,019

** - различия с контрольной группой достоверны $p < 0,05$.

Как видно из приведенных данных, максимальный индекс пролиферации Т-лимфоцитов наблюдается в группе животных, получавших противотуберкулезный препарат изониазид вместе с БАД в дозе 0,1 мл; практически такие же результаты показала группа животных, получавших изониазид и БАД в дозе 0,5 мл. Некоторая супрессия пролиферации наблюдается в группе , получавшей только БАД и только изониазид , а наименьшие показатели иммунного ответа в контрольной группе, так как животные находились уже в терминальной стадии развития туберкулеза.

Исследование масла черного тмина в опыте *in vitro* (согласно приказу МЗ РФ № 109 от 20.03.2003г.)

ЦЕЛЬ - изучение бактериостатической активности масла черного тмина в отношении микобактерий туберкулеза клинического штамма, чувствительного к известным ПТП *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед началом пробирочного опыта МЧТ стерилизовали автоклавированием при 1 атм. в течение 30 минут. Масло черного тмина изменило окраску со светло-коричневого до темно-коричневого оттенка, но сохранило прозрачность.

В качестве биотестов в работе использовали лабораторный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и клинический (дикий) штамм, выделенный из диагностического материала больного туберкулезом, находящегося на лечении в стационаре ЦНИИТ РАМН. Клинический штамм охарактеризован в отношении основных противотуберкулезных препаратов как чувствительный.

В основу работы положен принцип сопоставления данных по изучению бактериостатической активности Масла черного тмина и традиционно применяемого в клинике туберкулеза препарата пиразинамид. Критическая концентрация, т.е. концентрация препаратов в питательной среде при определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза к нему, составляет 200 мкг/мл.

В соответствии с планом исследования на начальном этапе проводили наращивание биомассы тест-штаммов, для чего выбранные культуры засеивали на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена (международный стандарт). Через 21 день из выросшей культуры готовили суспензию микобактерий в концентрации 5×10^8 млн. микробных тел в 1 мл. Готовую суспензию засеивали (по 0,2 мл) в пробирки с 2,0 мл жидкой питательной среды Школьниковой, содержащей изучаемые соединения в необходимых для исследования концентрациях:

МЧТ от 1000 до 7,8 мкг/мл

Z – от 500 до 31,2 мкг/мл;

Необходимая концентрация препаратов в пробирках достигалась титрованием (метод серийных разведений). В контрольные пробирки, не содержащие изучаемые препараты, также засеивали суспензию микобактерий в концентрации 5×10^8 млн. микробных тел в 1 мл.

После 14 суток инкубации в термостате при 37°C пробирки с жидкой средой центрифугировали в течение 15 мин. при 3000 об/мин., надосадочную жидкость сливали. Осадок засеивали в количестве 0,2 мл в две пробирки с плотной питательной средой Финна-2. Рост микобактерий на плотной среде

учитывали через 14 и 30 дней культивирования в термостате при 37°C. Контролем служили пробирки с посевами тест-штаммов, не подвергавшихся воздействию исследуемых веществ.

Далее из 0,1 мл оставшегося осадка готовили мазки и окрашивали по методу Циль-Нильсена. В связи с тем, что материал содержал масло, окрашивание жестким стандартным методом (пламя горелки, промывание в проточной воде) оказалось недейственным. Для дальнейшего проведения эксперимента использовали щадящий метод окраски. Подсушивание и фиксацию мазков проводили в термостате, затем в сухожаровом шкафу. Реагенты наносили на стекла с помощью микрокапельниц, промывали с помощью микрокапельницы и фильтровальной бумаги.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Минимальная бактерицидная концентрация препаратов (МБК) определялась как концентрация, вызывающая полное подавление роста микобактерий на плотной среде. Бактериостатический эффект (МИК – минимальная ингибирующая концентрация) характеризовался уменьшением числа колоний на плотных питательных средах по сравнению с контролем.

В соответствии с планом эксперимента еженедельно осуществлялся просмотр посевов.

Через 14 дней на всех контрольных пробирках наблюдалось появление колоний микобактерий, в опытных же пробирках роста не отмечалось.

Через 30 дней от момента посева на контрольных пробирках наблюдался массивный рост колоний МБТ. В пробирках, содержащих Z, отмечался рост единичных колоний МБТ при концентрации препарата 250 мкг/мл, при концентрации 125 мкг/мл и менее наблюдался массивный рост микобактерий, более 100 колоний.

В эти же сроки в пробирках, содержащих МЧТ, во всех исследуемых концентрациях роста колоний МБТ не наблюдалось.

Однако отсутствие роста колоний МБТ может быть связано не с бактерицидным эффектом, т.е. полностью разрушающим бактериальные клетки действием МЧТ, а с тем, что в пробирках с жидкой питательной средой на поверхности образовывалась масляная пленка, препятствующая проникновению кислорода, необходимого для дыхания микобактерий. Иначе говоря, бактериальные клетки в отсутствие кислорода утратили свои ростовые свойства.

Для дальнейшего изучения действия МЧТ на МБТ были приготовлены мазки из осадка (см. выше). Бактериоскопия мазков выявила наличие микобактерий во всех изучаемых концентрациях МЧТ, но в различной степени массивности. Так, при просмотре мазков из пробирок, содержащих МЧТ в концентрации 1000,0 и 500,0 мкг/мл, обнаружены единичные микобактерии во всем препарате, при концентрации МЧТ равной 250,0 мкг/мл – 10-20 микобактерий в препарате. Далее при уменьшении концентрации МЧТ обнаружено до 50 и более микобактерий в поле зрения.

Бактериоскопическое исследование выявило в данном опыте сохранение у микобактерий туберкулеза тинкториальных свойств (способность воспринимать окрашивание), и, следовательно, сохранение в нормальном состоянии клеточной оболочки.

Результаты культурального и бактериоскопического исследования представлены в таблицах 5 и 6.

ВЫВОД:

Исследуемое вещество - масло черного тмина - оказывает на микобактерии туберкулеза бактериостатическое действие при высокой концентрации препарата в питательной среде, равной 250-500 мкг/мл.

Таблица 5

Результаты культурального исследования действия масла черного тмина на M. tuberculosis

	H37Rv		Клинический штамм	
	МБК мкг/л	МИК мкг/мл	МБК мкг/мл	МИК мкг/мл
МЧТ	--	--	--	--
Z	250,0	125,0	375,0	250,0
Контр.	100□		100□	

Таблица 6

Результаты бактериоскопического исследования действия масла черного тмина на M. tuberculosis

	H37Rv		Клинический штамм	
	МБК мкг/л	МИК мкг/мл	МБК мкг/мл	МИК мкг/мл
МЧТ	--	500,0	--	500,0
Z	250,0	125,0	375,0	250,0
Контр.	100□		100□	

Результаты гистологического исследования

При внутривенном введении МБТ у мышей развивается экссудативно-некротический воспалительный процесс, поражающий различные паренхиматозные органы. Нелеченные животные (I группа) погибают от генерализованного туберкулеза через 1 месяц. К моменту гибели в легких и печени наблюдается полнокровие, сладж эритроцитов, в кровеносных сосудах крупного и среднего калибра выявляются юные и зрелые формы ПЯЛ. Вокруг сосудов формируются клеточные инфильтраты, состоящие из моно- и полинуклеаров; количество последних варьирует в зависимости от выраженности деструктивных изменений паренхимы.

Особенно крупные пневмонические фокусы формируются в легких; наряду с макрофагами и лимфоцитами в их составе определяются ПЯЛ. В пограничной с очагами паренхиме альвеолы частично или полностью заполнены отежной жидкостью, содержащей клеточный детрит, в том числе фрагменты разрушенных лейкоцитов. Обращают внимание скопления альвеолярных макрофагов, которые на гистологических срезах имеют прозрачную пенистую цитоплазму, а на полутонких – зеленую, из-за многочисленных гранул нейтральных липидов. Среди этих включений в ряде случаев видны скопления МБТ. Межалвеолярные перегородки утолщены за счет интерстициального отека и инфильтраций лимфоидно-гистиоцитарными элементами. В расширенных петлях капиллярной сети определяются моно- и полинуклеары, сладж эритроцитов.

Многие альвеолоциты II типа имеют крупные размеры, содержат хорошо выраженные секреторные гранулы. При окрашивании толуидиновым синим их фосфолипидное содержимое дает метакромазию, приобретает характерный красный оттенок. Значительное количество фосфолипидных включений определяется в апикальной цитоплазме клеток, что указывает на активную, компенсационную, выработку сурфактанта в этих зонах. На поверхности эпителиальной выстилки располагаются альвеолярные макрофаги, содержащие в цитоплазме аналогичные включения. Часть клеток имеет признаки деструкции или полностью разрушенную цитоплазму. Рядом с такими макрофагами часто располагаются ПЯЛ.

В печени нелеченных мышей, помимо экссудативной реакции, формирования периваскулярных инфильтратов, обращает внимание развитие дистрофических изменений гепатоцитов. Клетки печеночных балок имеют просветленную вакуолизированную цитоплазму, часто с признаками деструкции. В зонах некроза определяются ПЯЛ.

В легких, печени и селезенке животных 5-ой группы, получавших только БАД, наблюдается полнокровие, сладж эритроцитов, в кровеносных сосудах среднего и крупного калибра выявляются юные и зрелые формы ПЯЛ. Как и в контрольной группе, вокруг сосудов формируются клеточные инфильтраты, состоящие из моно- и полинуклеаров; количество последних

варьирует в зависимости от выраженности деструктивных изменений паренхимы,

Особенно крупные пневмонические фокусы формируются в легких, где они располагаются перибронхиально и периваскулярно. В их составе наряду с макрофагами различной степени зрелости, определяются ПЯЛ, в том числе в стадии деструкции. В пограничной с очагами паренхиме альвеолы частично или полностью заполнены экссудатом, содержащим клеточный детрит. Межальвеолярные перегородки утолщены за счет интерстициального отека и инфильтрации мононуклеарными элементами. В расширенных петлях капиллярной сети определяются моно- и полинуклеары, сладж эритроцитов.

В печени мышей 5-й группы, аналогично контрольной группе, помимо выраженной экссудативной реакции, периваскулярных инфильтратов, обращает внимание развитие дистрофических изменений гепатоцитов. Клетки печеночных балок имеют просветленную вакуолизированную цитоплазму, иногда с признаками деструкции. В зонах некроза также определяются ПЯЛ.

В селезенке отмечается гипертрофия фолликулов; между ними определяются мононуклеарные инфильтраты иногда с примесью ПЯЛ.

У животных 2-ой группы, получавших изониазид, наблюдается практически полное восстановление воздушности легочной паренхимы. Альвеолы хорошо расправлены, внутриальвеолярное пространство не содержит макрофаги или другие клеточные элементы воспаления. Пневмонические фокусы в легочной ткани не определяются. Вместе с тем, профили кровеносных сосудов и капиллярная сеть остаются расширенными, местами с признаками тромбообразования. В составе плотной эритроцитарной массы выявляются ПЯЛ. Особенно отчетливо они определяются в петлях расширенных капилляров межальвеолярных перегородок, что свидетельствует о сохранении МБТ или их измененных форм в кровеносном русле этих животных. Очевидно, поэтому межальвеолярные перегородки в отдельных участках паренхимы остаются утолщенными, имеют признаки отека, небольшой инфильтрации лимфоидно-гистиоцитарными элементами. Субплеврально выявляются очаги дистелектаза.

В печени деструктивные изменения гепатоцитов у мышей 2-ой группы выражены в значительно меньшей степени, чем у животных 5-ой группы; в перипортальной зоне определяются небольшие клеточные инфильтраты, содержащие единичные ПЯЛ.

Гипертрофия фолликул выражена в меньшей степени, местами сохраняются небольшие мононуклеарные инфильтраты.

Аналогичное состояние паренхиматозных органов наблюдается у мышей, получавший изониазид и БАД. При этом в легких мышей 4-й группы, получавших БАД в количестве 0,1 мл/мышь, расширение кровеносных сосудов и капилляров межальвеолярных перегородок выражено в меньшей степени, чем в 3-й группе. Кроме того, у животных, получавших БАД

0,1мл/мышь, мононуклеары и ПЯЛ выявляли в кровеносной сети значительно реже, чем в остальных терапевтических группах.

У животных 3-й группы, получавших БАД 0,5мл/мышь совместно с изониазидом, наблюдали локальный выход эритроцитов во внутриальвеолярное пространство, что указывает на возможное повышение проницаемости воздушно-кровяного барьера под влиянием этой концентрации препарата. Вместе с тем в печени и селезенке этих животных не отмечено каких-либо изменений по сравнению с 4-й группой.

ВЫВОДЫ

1. Установлен бактериостатический эффект БАД - масла черного тмина - на МБТ в сравнении с традиционно применяемыми противотуберкулезными препаратами *in vitro*.
2. Автоклавирование БАД – масло черного тмина - не снижает бактериостатического эффекта на МБТ при исследовании *in vitro*.
3. Пероральное введение БАД – масло черного тмина - в дозе 0,5мл/мышь увеличивало средний срок жизни мышей с экспериментальным туберкулезом по сравнению с контрольной группой животных в два раза.
4. Монотерапия БАД – масло черного тмина – в течение 1 месяца на модели экспериментального туберкулеза мышей уменьшало количество высеванных МБТ из легких по сравнению с животными контрольной группы в 100 раз.
5. Введение БАД в схему стандартной химиотерапии мышей с экспериментальным туберкулезом уменьшает количество высеваемых микобактерий в 1000 раз, что свидетельствует о потенцировании противотуберкулезного действия БАД в сочетании со стандартной противотуберкулезной терапией.
6. Введение БАД в схему стандартной специфической терапии показало положительное влияние на процессы восстановления структуры легких у экспериментальных мышей по сравнению с контрольной группой.
7. Установлено положительное влияние БАД – масло черного тмина- в сочетании с противотуберкулезной химиотерапией на состояние Т- и В – клеточного звеньев иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленный бактериостатический эффект БАД – масло черного тмина – на МБТ у мышей с экспериментальным туберкулезом, который потенцировался при введении БАД в схему стандартной противотуберкулезной терапии, что подтверждается и иммунологическими исследованиями, требует дальнейших экспериментальных исследований для решения вопроса о регистрации БАД – масло черного тмина – в качестве нового противотуберкулезного препарата.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ:

- БАД – биологически активная добавка
- МБТ - микобактерии туберкулеза
- МБК - минимальная бактерицидная концентрация
- МИК - минимальная ингибирующая концентрация
- КОЕ - колониеобразующие единицы
- ПТП - противотуберкулезные препараты
- Z - пиразинамид
- МЧТ - масло черного тмина
- ПЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
- ССЖ – средний срок жизни

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Демихова О.В. д.м.н. – руководитель темы *Demikh*

Бочарова И.В. к.б.н. – ответственный исполнитель *Bocharova*

Поспелов Л.Е. д.б.н. – исполнитель *Pospelov*

Лепеха Л.Н. д.м.н. – исполнитель *Lepеха*

Мартынова Л.П. к.б.н. – исполнитель *Martynova*

Авдиенко В.Г. к.б.н. – исполнитель *Avdienko*

Кондратьева Е.В. к.б.н. – исполнитель *Kondratyeva*