

К.И. Усов¹, Г.Г. Юшков¹, А.А. Гущина¹, А.С. Гушин²

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗОНИАЗИДА® И ИЗОВИТА® В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

¹ Ангарская государственная техническая академия, НИИ биофизики (Ангарск)² ОАО «Фармасинтез» (Ангарск)

Было проведено доклиническое исследование двух препаратов: «Изониазид®» и «Изовит®». При сравнении физиологических, биохимических, токсикологических и морфофункциональных показателей было установлено, что введение пиридоксина гидрохлорида в состав единой лекарственной формы — «Изовит®» — снижало большинство токсических проявлений.

Ключевые слова: противотуберкулезные препараты, изониазид, изовит

TOXICOLOGICAL ESTIMATION OF ISONIAZIDUM® AND ISOVITUM® IN EXPERIMENT

K.I. Usov¹, G.G. Yushkov¹, A.A. Gushchina¹, A.S. Gushchin²¹ Angarsk State Technical Academy, Biophysics Scientific Research Institute, Angarsk² Farmasintez, Angarsk

We realized pre-clinical study of two preparations — «Isoniazidum®» and «Isovitum®». At the comparison of physiological, biochemical, toxicological and morphofunctional indices we determined that introduction of pyridoxine hydrochloride in mixture of unified medicinal form — «Isovitum®» — reduced most of toxic manifestations.

Key words: antituberculous preparations, Isoniazidum, Isovitum

Выступая в 1969 г. в Конгрессе США, Вильям Стюарт (Surgeon General) заявил, что пришла пора «закрыть книгу инфекционных болезней». Однако на рубеже XX — XXI столетий стало совершенно очевидным, что эта книга не только не закрыта, но еще далеко не прочитана. В настоящее время туберкулез — эпидемически распространенное заболевание во многих регионах мира — относят к «вновь вернувшимся заболеваниям» [1]. По оценке ВОЗ, треть населения Земли инфицирована *Mycobacterium tuberculosis*; общее количество заболевших и умерших от туберкулеза в 2006 г. составило 9,2 и 1,7 млн. человек соответственно (WHO, 2008). По данным Роспотребнадзора РФ (март 2009 г.), в 2009 году ожидается рост заболеваемости туберкулезом, и в течение 3-х лет ситуация может выйти из-под контроля [3, 4]. Лечение больных туберкулезом требует длительного, непрерывного и одновременного приема 4 — 5 антибактериальных препаратов (DOTS-plus стратегия), которые, помимо терапевтического эффекта, обладают высокой токсичностью, что оказывает повреждающее действие на многие органы и системы. В последние время на фармацевтический рынок вышли новые формы противотуберкулезных препаратов — комбинированные. Факт появления данных препаратов говорит о необходимости их дальнейшего доклинического исследования с целью выявления общих токсических свойств: об этом также говорилось на научно-практической конференции «Противотуберкулезные лекарственные препараты в Российской Федерации. Реалии и перспективы» [5]. В частности, на конференции была подчеркнута необходимость дальнейших поисков в создании

комбинированных противотуберкулезных препаратов, часть из которых уже прошла доклинические и клинические испытания и рекомендована для практического применения.

Цель работы: сравнить физиологические, биохимические и морфофункциональные изменения при введении препаратов «Изониазид®» (изониазид 300 мг) и «Изовит®» (изониазид 300 мг + пиридоксина гидрохлорид 15 мг) производства ОАО «Фармасинтез» (г. Иркутск) в условиях эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 252 нелинейных белых крысах (самцы, самки). Крысы содержались по 6 животных в клетке в стандартных условиях при температуре 20 — 22 °С и естественном световом режиме на стандартном рационе специализированного вивария (ветеринарное удостоверение 238 № 0018304). Получали питьевую воду без ограничений. Критериями включения животных в эксперимент являлось ветеринарное заключение местной службы Госветнадзора, в ряде случаев — заключение Областной ветеринарной лаборатории на бактерионосительство. Динамику изучали на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки после введения образцов препарата на фоне динамического контроля и исходного уровня величин показателей [2, 4] по следующим выбранным:

1. Физиологические показатели: температура тела (измеряли с помощью электронного термометра «Омрон»), АД, ЧСС, суммационно-пороговый показатель (СПП), потребление кислорода (определяли с использованием прибора «Spirolyt-2»),

показатели физиологических механизмов поведения животных (двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, изменение потребления пищи и воды).

2. Биохимические показатели: активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание общего белка, билирубина, холестерина, аскорбиновой кислоты, глюкозы и мочевины в сыворотке крови, содержание ксантуреновой кислоты в моче. Для забора крови у крыс проводили эктаназию путем декапитации с соблюдением Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Моча предварительно собиралась в обменные клетки Simax.

Для оценки морфофункциональных изменений проводили: а) патоморфологические исследования, что включало аутопсию с макроскопическим описанием, измерение относительной массы органов (сердце, легкие, печень, селезенка, почки, головной мозг, щитовидная железа); б) гистологическое исследование тканей печени, щитовидной железы, легких, почек, желудка. Расчет среднесмертельных доз проводили по Керберу. Животным препараты вводили в виде водного раствора внутривентрикулярно, через рот с помощью металлического атравматического зонда: терапевтическую (8 мг/кг), промежуточную (50 мг/кг) и токсическую (140 мг/кг) дозы, что составляет 1/10 от LD₅₀ для препарата «Изовит®».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При внутривентрикулярном введении образца препарата «Изониазид®» LD₅₀ составила 1667 ± 48,5 мг/кг (самцы) и 1683 ± 48,5 мг/кг (самки). Для препарата «Изовит®» LD₅₀ = 6750 ± 216,8 мг/кг (самцы) и 6657 ± 216,8 мг/кг (самки). По данным токсикометрии, статистически значимых различий между самцами и самками не установлено. В среднем LD₅₀ для препарата «Изовит®» оказалась выше в 4,00 раза. Введение препарата «Изовит®» в дозе 140 мг/кг привело к снижению прироста массы тела, начиная с седьмых суток, но со значительно меньшей направленностью, чем при введении препарата «Изониазид®». Снижение потребления воды было отмечено с 1–3-х суток наблюдения по сравнению с изониазидом, где снижение в потреблении воды было отмечено во всех сроках наблюдения. АД повышалось разово и в значительно меньшей степени, ЧСС увеличивалась на 3-и сутки, суммационно-пороговый показатель повышался на 3–7-е сутки. Уровень потребления кислорода повышался только на последние сутки. Продолжительность гексеналового сна увеличивалась с 3-х суток. При оценке двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс ожидаемого подавления практически не отмечалось на фоне динамического контроля, за исключением максимальных и преимущественно разовых отличий при введении препарата «Изовит®» в дозе 50 мг/кг и отсутствия отличий при введении препарата «Изониазид®» в дозе 8 мг/кг. Из показателей крови было отмечено повышение лейкоцитов и снижение эритроцитов и, как след-

ствие, понижение гемоглобина на 1-е и 3-и сутки при дозе 140 мг/кг. Время свертывания крови от такового в контроле не отличалось.

Результаты биохимических показателей при воздействии препаратами: «Изониазид®» и «Изовит®» и представлены в таблице 1.

При введении препарата «Изониазид®» в дозе 140 мг/кг со второго месяца было обнаружено повышение содержания общего белка в сыворотке крови, активности АЛТ. Пиковые изменения отмечены через три месяца в виде еще большего повышения активности АЛТ, АСТ, общего белка, билирубина и мочевины. Большинство биохимических показателей имело ту же направленность изменений, что и при введении препарата «Изовит®», но степень их количественных проявлений была несколько ниже. К третьему месяцу введения изониазида показатель АЛТ понизился, активность АСТ практически не изменилась, содержание общего белка и билирубина, содержание мочевины. Динамика изменения концентрации ксантуреновой кислоты в моче крыс при введении исследуемых препаратов в течение трех месяцев в дозе 100 мг/кг отражена в таблице 1. При этом выделение ксантуреновой кислоты с мочой оказалось крайне неустойчивым: с первого по третий месяц оно составило, соответственно, 1,6, 1,7 и 1,9 мкг/кг, что свидетельствует о менее выраженном влиянии системы «изониазид + витамин В₆» на метаболизм триптофана. Наличие основного действующего вещества — изониазида — в моче крыс контролировали с помощью качественной реакции, которая была положительной во всех пробах. Содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови при введении изониазида снижалось по сравнению с динамическим контролем. У крыс-самцов при дозе 5 мг/кг оно составило 27,9 ± 0,3, при дозе 50 мг/кг — 23,9 ± 0,5, при дозе 100 мг/кг — 17,6 ± 0,6. Для крыс-самок динамика была аналогичной. Статистическую оценку достоверности полученных данных проводили с использованием критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

В соответствии с требованиями доклинических исследований морфологические изменения регистрировали по окончании срока введения. При вскрытии животных, подвергавшихся воздействию изониазида в дозе 100 мг/кг, обнаружено умеренное полнокровие магистральных сосудов печени. Синусоиды и центральные вены печени представлены без выраженных изменений. Гепатоциты обычной формы и окраски, ядра хорошо выражены. Клетки Купфера без видимых отличий от контроля. В легких магистральные сосуды полнокровны, межальвеолярные перегородки утолщены за счет полнокровия капилляров и пролиферации альвеолоцитов, просветы альвеол свободные, слизистая бронхов складчатая. Сосуды почек умеренно полнокровны, эпителий извитых канальцев без существенных изменений, клубочки обычной формы, просветы извитых канальцев свободные. В головном мозге умеренно выражена отечность мелких и средних сосудов коры, гомогенизация хроматина ядер нейронов. Красная

Таблица 1

Динамика биохимических показателей

№ п/п	Доза (мг/кг)	Мочевина сыворотки (ммоль/л)		Общий белок сыворотки (г/л)		Активность АЛТ в сыворотке (ед/л)		Активность АСТ в сыворотке (ед/л)		Глюкоза (ммоль/л)		Холестерин общий (ммоль/л)		Билирубин общий (ммоль/л)	
		Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Срок наблюдения – 30-е сутки															
1	100	8,1 ± 0,05	8,1 ± 0,06	78,6 ± 1,0	79,2 ± 1,0	62,0 ± 2,0	62,8 ± 1,8	354,8 ± 2,1	359,6 ± 2,0	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,2	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,03	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,04
		8,6 ± 0,05*	8,5 ± 0,04*	78,4 ± 0,8	79,1 ± 1,0	64,2 ± 2,0	65,0 ± 2,1	357,4 ± 2,4	358,1 ± 2,1	6,4 ± 0,2*	6,3 ± 0,2*	1,6 ± 0,04	1,7 ± 0,02	8,1 ± 0,05	8,1 ± 0,04
	50	8,1 ± 0,05	8,1 ± 0,03	78,1 ± 1,0	78,4 ± 1,1	61,5 ± 2,1	62,3 ± 1,9	351,4 ± 2,1	352,6 ± 1,9	5,7 ± 0,1	5,8 ± 0,2	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,03	8,1 ± 0,05	8,1 ± 0,04
		8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03	77,9 ± 1,0	78,1 ± 1,0	61,4 ± 1,8	62,0 ± 2,0	353,5 ± 2,1	354,8 ± 2,0	5,8 ± 0,1	5,9 ± 0,1	1,6 ± 0,02	1,6 ± 0,03	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,04
	5	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,03	78,3 ± 0,6	78,9 ± 0,7	61,2 ± 2,0	62,0 ± 2,1	350,4 ± 1,9	352,1 ± 2,0	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,04	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,03
		8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,02	78,4 ± 0,6	78,9 ± 0,8	61,3 ± 1,8	61,5 ± 1,6	351,2 ± 2,0	353,2 ± 1,9	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,03	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03
	Контроль	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,03	78,6 ± 0,9	79,0 ± 1,1	61,6 ± 1,5	61,9 ± 1,8	351,6 ± 2,1	355,4 ± 1,8	5,7 ± 0,1	5,8 ± 0,1	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,04	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,04
Срок наблюдения – 60-е сутки															
2	100	8,2 ± 0,05	8,2 ± 0,05	81,4 ± 0,6	82,0 ± 0,6	70,1 ± 2,0*	71,0 ± 1,5*	356,3 ± 2,0	359,4 ± 1,8	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,2	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,03	8,2 ± 0,05	8,1 ± 0,06
		8,3 ± 0,04	8,2 ± 0,05	86,5 ± 0,6*	90,0 ± 1,0*	86,5 ± 2,0*	88,3 ± 1,9*	359,7 ± 2,1	360,1 ± 1,9	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2	1,6 ± 0,04	1,7 ± 0,04	8,2 ± 0,06	8,1 ± 0,06
	50	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,04	80,1 ± 0,5	80,8 ± 0,6	62,0 ± 2,0	62,6 ± 2,0	355,2 ± 1,6	357,1 ± 2,0	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	1,6 ± 0,03	1,6 ± 0,04	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,04
		8,2 ± 0,03	8,1 ± 0,03	81,6 ± 0,6	83,4 ± 1,0	65,3 ± 2,0	66,4 ± 2,1	354,4 ± 2,0	356,2 ± 1,9	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	1,6 ± 0,03	1,6 ± 0,03	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03
	5	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,03	80,1 ± 0,7	78,4 ± 1,0	61,0 ± 1,6	61,7 ± 2,0	356,9 ± 2,0	359,4 ± 1,6	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,3	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,04	8,1 ± 0,03	8,1 ± 0,03
		8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03	79,4 ± 0,8	77,4 ± 1,0	61,1 ± 1,5	62,0 ± 2,0	357,0 ± 1,6	358,4 ± 1,9	5,7 ± 0,1	5,8 ± 0,1	1,6 ± 0,02	1,7 ± 0,05	8,1 ± 0,02	8,1 ± 0,04
	Контроль	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03	80,0 ± 0,5	78,3 ± 0,6	61,4 ± 1,8	61,8 ± 2,0	356,8 ± 1,9	358,5 ± 2,0	5,7 ± 0,1	5,8 ± 0,1	1,6 ± 0,04	1,7 ± 0,03	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,05
Срок наблюдения – 90-е сутки															
3	100	8,6 ± 0,06*	8,4 ± 0,05*	91,3 ± 1,0*	91,8 ± 1,0*	90,3 ± 2,0*	91,4 ± 2,4*	370,4 ± 2,1*	371,5 ± 2,0*	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	1,7 ± 0,05	1,7 ± 0,06	9,0 ± 0,07*	8,7 ± 0,06*
		9,4 ± 0,06*	9,3 ± 0,05*	92,4 ± 0,9*	93,0 ± 1,1*	99,6 ± 2,4*	99,8 ± 2,1*	369,1 ± 2,0*	370,2 ± 2,4*	5,0 ± 0,2	5,1 ± 0,1	1,7 ± 0,04	1,8 ± 0,04	9,3 ± 0,08*	8,8 ± 0,04*
	50	8,3 ± 0,06	8,2 ± 0,06	81,3 ± 1,0	83,6 ± 1,1	80,4 ± 2,0	81,2 ± 1,8*	363,2 ± 3,0	367,9 ± 2,1	5,1 ± 0,2	5,2 ± 0,2	1,6 ± 0,04	1,7 ± 0,04	8,3 ± 0,2	8,3 ± 0,1
		9,0 ± 0,05	9,1 ± 0,06	86,5 ± 0,6*	87,1 ± 0,5	84,1 ± 2,3*	85,8 ± 2,4*	361,7 ± 2,0	366,7 ± 1,8	5,1 ± 0,2	5,4 ± 0,2	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,03	8,4 ± 0,1	8,3 ± 0,08
	5	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03	80,0 ± 0,7	80,3 ± 0,8	73,0 ± 1,6	70,1 ± 2,0	357,3 ± 1,1	360,6 ± 2,0	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,2	1,7 ± 0,03	1,6 ± 0,04	8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,1
		8,2 ± 0,04	8,1 ± 0,05	79,5 ± 0,5	80,0 ± 0,4	73,1 ± 1,8	69,4 ± 2,0	360,2 ± 1,9	361,4 ± 2,1	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,02	8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,06
	Контроль	8,2 ± 0,03	8,1 ± 0,04	79,6 ± 1,0	80,1 ± 0,5	72,8 ± 1,9	69,3 ± 2,1	358,4 ± 3,0	359,2 ± 2,4	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,1	1,8 ± 0,05	1,7 ± 0,02	8,2 ± 0,06	8,1 ± 0,05

Примечание: * – отличия статистически достоверны при $P < 0,05$; первая строка – Изовит; вторая строка – Изониазид без В6.

пульпа селезенки полнокровна, лимфоидные фолликулы хорошо выражены, с четкими центрами размножения. В средней и каудальной части желудка встречались небольшие участки дистрофических изменений эпителия. В сердце обнаружены участки цитолиза микрофибрилл, разволокненность пучков. У крыс, получавших препарат «Изониазид®» в промежуточной дозе, морфологические изменения выражены крайне неотчетливо, а при терапевтической дозе признаков структурных повреждений не отмечено. Методами гистохимии было обнаружено снижение активности сукцинатдегидрогеназы в печени животных, снижение содержания гликогена при токсической дозе.

На вскрытии животных при введении препарата «Изовит®» в дозе 100 мг/кг визуально определяемых признаков патологии не обнаружено, что положительно отличает действие препарата «Изовит®» от препарата «Изониазид®». В печени не было обнаружено полнокровия сосудов, синусоиды свободные, клетки Купфера округлены, но не увеличены в размерах. В головном мозге по сравнению с изменениями, вызванными изониазидом, упомянутые проявления были выражены в значительно меньшей степени.

В почках при токсической дозе нарушений в гомодинамике не выявлено, обратили на себя внимание слабо выраженные явления белковой дистрофии в эпителии извитых канальцев. В сердце — незначительные признаки застойного полнокровия без дистрофических изменений миофибрилл. В щитовидной железе признаков патологии не отмечено. В слизистой части желудка встречались участки дистрофически измененного железистого эпителия, в селезенке — нерезко выраженное полнокровие, в легких в токсической дозе отмечено некоторое расширение просвета альвеол. У животных, получавших препарат «Изовит®» в промежуточной дозе, морфологические изменения выражены менее отчетливо, а при терапевтической дозе структурных повреждений не отмечено. При гистохимических исследованиях печени животных при 100 мг/кг установлено снижение активности сукцинатдегидрогеназы как результат отсутствия влияния пиридоксина на степень нарушения гликолиза. При этом активность лактатдегидрогеназы в печени ни при одной из доз от контроля не отличалась, что позволяет считать пиридоксин в таком сочетании достаточным компенсирующим фактором в системе анаэробного окисления. Снижение гликогена в печени снижалось при воздействии изовита как в токсической, так и в терапевтической дозе, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния пиридоксина на процесс накопления гликогена в печени. Активность щелочной фосфатазы при введении изовита в токсической дозе повышалась, в терапевтической — оставалась на уровне динамического контроля. Выявлена умеренная инфильтрация нейтральными липидами при токсической дозе изовита, выраженная при токсической дозе изониазида. Было отмечено отчетливое снижение активности моноаминоксидазы в печени животных, получавших изониазид в дозе 100 мг/кг, и отсутствие такового при введении изовита в той же дозе. Столь же характерной зависимости при введении изовита в промежуточной дозе не отмечено. В целом проведенные экспериментальные исследования препарата «Изониазид®» показали, что в дозах, значительно превышающих терапевтическую (140 и 50 мг/кг), препарат при однократном введении вызывает характерные для соединений гидразинового ряда изменения в состоянии животных. Доза 8 мг/кг не вызвала у крыс каких-либо отклонений от контроля, что свидетельствует о приемлемой переносимости препарата с отнесением его к малотоксичным по Hodde и Sterner [4]. Спектр биохимических и морфофункциональных изменений при введении препарата «Изовит®» животным был сходен со свойствами изониазида, но проявлялся в значительно меньшей степени, чем при введении препарата «Изониазид®». Особенно это проявилось при исследовании изовита по показателю летальности. Введение препарата «Изовит®» в несколько раз сократило летальность и, по-видимому, способствовало снижению общетоксического действия, что выразилось в уменьшении отличий от контроля по большинству из выбранных показателей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мархаев А.Г., Молонов А.Д., Убеева И.П., Бадлеева М.В. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в районах приграничных с неблагоприятными по туберкулезу странами // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — Улан-Удэ, 2009. — Т. 66, № 2. — С. 271 — 273.
2. Маслаускене Т.П., Николаева С.Б. Побочное действие противотуберкулезных препаратов. // Сибирский медицинский журнал. — Иркутск, 2005. — № 3. — С. 13 — 19.
3. Компанцева Е.В., Овчаренко Л.П., Халата А.В., Кулешова С.А. Фармакокинетика и общетоксическая оценка гранул изониазида и пиридоксина гидрохлорида // Экология человека. — Петрозаводск, 2007. — № 2. — С. 7 — 10
4. Портяная Н.И., Юшков Г.Г. Биохимия гидразинов. — Ангарск: АГТА, 2005. — С. 92 — 93.
5. Производство противотуберкулезных лекарственных препаратов в РФ. Реалии и перспективы : мат. науч.-практ. конф. // Проблемы туберкулеза и болезни легких. — 2005. — № 8. — С. 60 — 62.

Сведения об авторах

Усов Константин Ильич — аспирант НИИ биофизики Ангарской государственной технической академии (665833, г. Ангарск, 9-й микрорайон, д. 91, кв. 90; тел.: 8 (908) 655-76-84; e-mail: chemist545@mail.ru).

Юшков Геннадий Георгиевич — кандидат медицинских наук, заместитель директора по научной работе НИИ биофизики Ангарской государственной технической академии.

Гущина Алла Анатольевна — заведующая биохимической лабораторией отдела токсикологии НИИ биофизики Ангарской государственной технической академии.

Гущин Александр Сергеевич — директор ОАО «Фармасинтез».