

УДК 615.9

К ПРОБЛЕМЕ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ И НЕ СОДЕРЖАЩИХ ВИТАМИН В₆

© 2009 К.И. Усов¹, Г.Г. Юшков¹, А.А. Гущина¹, А.С. Гушин

¹ НИИ биофизики, Ангарская государственная техническая академия

² ОАО «Фармасинтез»

Статья получена 8.10.2009 г.

Последнее время в современные противотуберкулезные препараты стали включать пиридоксин гидрохлорид. Поэтому возникла потребность в доклиническом исследовании данных лекарственных форм в сравнительном аспекте. С этой целью нами было проведено сравнительное доклиническое исследование двух лекарственных форм: «Протубэтам» и «Протубэтам В₆» по биохимическим показателям.

Ключевые слова: *противотуберкулезные препараты, пиридоксина гидрохлорид, биохимические показатели*

Со времен Роберта Коха, открывшего 24 марта 1882 г. микобактерию туберкулеза (палочку Коха), был синтезирован целый ряд химических веществ, направленных на подавление метаболизма микобактерии и лизиса ее толстой клеточной оболочки, разработаны методики лечения, но, к сожалению, проблема туберкулеза все еще актуальна. В мире ежегодно от туберкулеза умирает 2-3 миллиона человек. В России это заболевание прочно и с большим отрывом заняло первое место среди всех инфекций и продолжает быстро распространяться [7], превышая аналогичные показатели в странах Европы в 5-8 раз. В течение последних 3 лет ежегодно заболевает около 117-120 тысяч российских граждан и умирает около 25 тысяч человек (по данным Всемирной организации здравоохранения). В 2008 г. показатель заболеваемости туберкулезом составил 85,0 на 100 тысяч населения.

Туберкулез определяет уровень социально-экономической напряженности в обществе вне зависимости от того, какую группу населения используют для анализа заболеваемости. Негативные экономические изменения и социально-экономические проблемы влияют на привычный уклад жизни большинства населения, провоцируя тем самым изменение иммунного статуса всех без исключения членов общества. Социально отягощенные лица являются одной из наиболее важных групп риска заболевания туберкулезом. К этой группе относятся прибывшие из учреждений УИН МЮ РФ, лица злоупотребляющие алкоголем, наркоманы, безработные, эмигранты, лица БОМЖ. Численность данных категорий больных постоянно увеличивается в связи с падением уровня жизни и притоком

эмигрантов из стран СНГ [7]. Также некоторые авторы [2, 4] считают, что рост туберкулеза в России наблюдается на фоне тотальных прививок новорожденных, в роддомах (БЦЖ – против туберкулеза) так называемыми: «живыми» вакцинами, или их ослабленными модификациями. Согласно Российскому календарю профилактических прививок, прививку БЦЖ ставят ребенку в первые дни жизни, когда происходит только формирование иммунной системы [4].

Последнее время в современные, комбинированные, противотуберкулезные препараты стали включать витамин В₆ как витаминный компонент, обладающий антидотными свойствами [3]. Для определения его роли в составе комбинированных форм нами было проведено сравнительное экспериментальное (доклиническое) исследование [6] 2 лекарственных форм: «Протубэтам В₆», содержащий в своем составе: 300 мг изониазида, 800 мг этамбутола гидрохлорида и 20 мг пиридоксина гидрохлорида, и «Протубэтам», не содержащего пиридоксина гидрохлорида, по биохимическим показателям крови и мочи. Для доклинического изучения биохимических показателей был поставлен острый эксперимент на двух группах животных: 1-я группа: беспородные собаки (самцы, самки) [4]; 2-я группа: нелинейные белые крысы (самцы, самки). Собаки размещались в отдельных, специализированных боксах с подогреваемым полом, выгул осуществлялся в вольерах вивария. Один раз в день животные получали воду комнатной температуры в объеме 1,45 л. Корм один раз в день. Крысы содержались по 6 животных в клетке в стандартных условиях при температуре 20-22°C и естественном световом режиме на стандартном рационе вивария. 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 по следующим выбранным биохимическим

Усов Константин Ильич, аспирант. E-mail: chemist545@mail.ru

Юшков Геннадий Георгиевич, кандидат медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник. E-mail: priroda@ang.ru

Гущина Алла Анатольевна, заведующая лабораторией
Гушин Александр Сергеевич, директор ОАО Фармасинтез. E-mail: info@pharmasyntez.com

показателям: аланинаминотрансферазу (АлАТ), аспартатаминотрансферазу (АсАТ), общий белок, общий билирубин, холестерин, глюкозу, мочевины определяли в сыворотке крови, содержание ксантуреновой кислоты и наличие изониазида и его метаболитов – в моче животных. Для забора крови у крыс проводили эвтаназию путем декапитации, моча собиралась в обменные клетки Simax с соблюдением Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

В ходе эксперимента 1-й группе животных введение «Протубэама» и «Протубэама В₆» производили однократно, перорально или дробно (в 3, 4 разовых подходах в течение 4-6 часов) с кусочками мяса в дозах: 140 мг/кг (токсическая), 70 мг/кг (промежуточная) и 10 мг/кг (терапевтическая). Изменения динамики биохимических показателей наблюдалось при дозе 140 мг/кг и частично 70 мг/кг. При введении «Протубэама» было обнаружено небольшое повышение активности АлАТ 276-284 ед/л самцы, 243-251 ед/л самки при дозе 140 мг/кг и АсАТ на 1-7 сутки, увеличение количества общего белка 72-76 г/л, 70-73 г/л при дозе 140 мг/кг на 1-7 сутки. Изменение общего билирубина не отмечено. Аналитический сигнал был обнаружен при проведении качественной реакции на изониазид и его отсутствие характерное для ацетилированных форм изониазида во всех пробах. Ксантуреновая кислота как маркер измененного обмена триптофана была обнаружена только при токсической 1,3-0,4 мкг/мл, 0,7-0,1 мкг/мл и промежуточной дозе 0,8-0,1 мкг/мл, 0,1-0,3 мкг/мл на 1-14 сутки. Введение «Протубэама В₆» сопровождалось повышением активности АлАТ, на фоне динамического контроля 266-215 ед/л самцы – 258-204 ед/л самки с 1 по 14 сутки в дозе 140 мг/кг, 230-192 ед/л – 241-188 ед/л в дозе 70 мг/кг. Аналогичное повышение активности было характерно и для АсАТ. Нами было не обнаружено при введении «Протубэама» теоретически ожидаемого одновременного снижения АсАТ и АлАТ, характерного в ситуации недостаточности пиридоксина, так как пиридоксальфосфат является производным витамина В₆, который катализирует перенос аминокислотной группы аланина на альфа-кетоглутаровую кислоту с образованием пировиноградной кислоты и глутаминовой кислоты. А как уже было доказано [5], переаминирование происходит только в присутствии кофермента – пиридоксальфосфата, поэтому одновременное снижение активности АсАТ и АлАТ считают диагностической тестовой пробой в ситуации снижения концентрации витамина В₆. Теоретически снижение концентрации витамина происходит из-за быстрого выведения водорастворимого витамина и антагонистического отношения его с изониазидом. В результате проведенного нами эксперимента эффект был обратным, направленным в сторону повышения активности печеночных ферментов. При сравнении активности печеночных проб аминотрансфераз при введении лекарственных форм содержащих и не содержащих витамин В₆ было не обнаружено четких

различий в динамике, несмотря на тот факт, что в состав «Протубэама В₆» входит 20 мг витамина В₆. Данное предположение, наталкивает на вопрос о целесообразности включения в «Протубэама В₆» витамина В₆.

Так же было отмечено некоторое повышение количества общего белка – 74-78 г/л самцы, 75-77 г/л самки при дозе 140 мг/кг и общего билирубина – 10-12 ммоль/л самцы, самки при дозе 140 мг/кг. Величины содержания ксантуреновой кислоты были крайне неустойчивы. Группа с введением терапевтической дозы от контроля не отличалась. В моче 1-й группы животных не удалось выявить ацетилированных продуктов изониазида, хотя сам изониазид качественной реакцией определялся.

При однократном внутрижелудочном введении 2-й группе животных, в дозах: 140 мг/кг (токсическая), 70 мг/кг (промежуточная), 10 мг/кг (терапевтическая) «Протубэама» и «Протубэама В₆» в виде водной суспензии с помощью металлического зонда с атравматичным наконечником определение показателей вели на 1, 3, 7, 14, 21 сутки на фоне динамического контроля. Это позволило обнаружить при введении «Протубэама» в остром эксперименте, повышение активности АлАТ для токсической дозы 101,4±7,8 - 120,5±8,3 ед/л самцы, а у самок наблюдался незначительный эффект повышения 98,2±6,7 - 99,6±7,1 на 1-3 сутки, самцы - самки, с 7-21 сутки, при $p \leq 0,05$. Идентичный, но менее выраженный эффект был зафиксирован при дозе 70 мг/кг. Аналогичная динамика была характерна для АсАТ. Также наблюдалось повышение уровня мочевины 8,1±0,05 - 8,7±0,06 ммоль/л и 8,2±0,05 - 8,6±0,07 ммоль/л, глюкозы 5,66±0,06 - 7,2±0,08 ммоль/л и 5,64±0,07 - 6,91±0,07 ммоль/л на 7 сутки при дозе 140 мг/кг, на 14 и 21 сутки показатель от контроля не отличался. С 1-3 сутки при дозе 140 мг/кг повышалось количество общего белка 94,2±1,9 - 95,4±1,8 г/л и 92,8±4,3 - 93,2±2,8 г/л, при дозе 70 мг/кг – тенденции в сторону понижения. Количество билирубина несколько повышалось к 14 суткам при дозе 140 мг/кг 8,2±0,09 - 9,2±0,1 ммоль/л и 8,2±0,09 - 9,0±0,2 ммоль/л. При дозах 140 мг/кг и 70 мг/кг на 3-14 сутки после введения в моче животных была обнаружена ксантуреновая кислоты 9,1±1,6 - 0,96±0,7 мкг/мл и 8,6±2,4 - 0,28±0,2 мкг/мл. Доза 10 мг/кг существенного отличия показателей от контрольного уровня не вызвала, как и отличий между самцами и самками.

При однократном введении «Протубэама В₆» наблюдалось повышение активности АлАТ в сыворотке крови на 1-3 сутки при дозах 140 мг/кг составило 93,6±6,5 - 101,2±8,3 ед/л и 96,6±4,9 - 117,2±6,7 ед/л, 70 мг/кг – 81,1±3,6 - 84,8±5,0 ед/л и 84,3±5,0 - 88,1±6,7 ед/л, а затем наблюдался спад активности, что было характерно и при введении «Протубэама». Динамика активности АсАТ была направлена в сторону повышения. На 7-е сутки при дозе 140 мг/кг было

установлено повышение уровня мочевины $8,6 \pm 0,07$ и $8,7 \pm 0,07$ ммоль/л, общего белка $87,4 \pm 0,9$ и $85,2 \pm 1,4$ г/л, глюкозы $7,0 \pm 0,08$ и $6,88 \pm 0,07$ ммоль/л, на 14 и 21 сутки показатель не отличался от фона динамического контроля, при дозе 70 мг/кг была характерна аналогичная тенденция. Количество билирубина несколько повышалось к 14 суткам при токсической дозе $9,4 \pm 0,1$ и $9,1 \pm 0,1$ ммоль/л. Введение дозы 140 мг/кг на 1-7 сутки вызвало появление ксантуреновой кислоты в концентрации $3,4 \pm 2,0 - 0,5 \pm 0,3$ мкг/мл и $1,6 \pm 0,7 - 0,1 \pm 0,09$ мкг/мл, а при 70 мг/кг кислота была идентифицирована только на 1 сутки – $0,9 \pm 0,4$ и $0,5 \pm 0,1$ мкг/мл. Качественная реакция на изониазид и его метаболитизированные формы во всех пробах была положительной.

Выводы: отмечены биохимические сдвиги в активности печеночных ферментов при введении токсической и промежуточной дозы, что является признаком белково-жировой дистрофии печени [1]. Общая направленность изменений при однократном введении «Протубетама» и «Протубетама В₆» оставалась по существу одинаковой. Полученные биохимические сдвиги показателей при введении токсической и промежуточной доз были также подтверждены гистохимическими и морфологическими данными, в частности выраженной белковой дистрофией гепатоцитов в области портального тракта, просветлением цитоплазмы перинуклеарных зон и некоторым снижением гликогена в печени. Не было получено ожидаемого токсического действия изониазида при введении терапевтической дозы, хотя

исследование на собаках показали большую чувствительность этого вида животных к препарату, но, по-видимому, связанную с замедлением метаболизма изониазида и с задержкой его в крови из-за не выраженности процессов ацетилирования у собак [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Коваленко, В.М. Влияние експериментальної полівітамінної композиції на процеси детоксикації ізоніазида в печінці щурів за умов його тривалої дії / В.М. Коваленко, А.К. Вороніна, Г.М. Шаяхметова // Експериментальна і клінічна медицина. – 2004. - № 1. – С. 20-23.
2. Коток, А. Беспощадная иммунизация. Правда о прививках. – Новосибирск: Гомеопатическая книга, 2008. – С. 504-551.
3. Портяная Н.И. Биохимия гидразинов/ Н.И. Портяная, Г.Г. Юшков – Ангарск: АГТА, 2005. – 92 с.
4. Червонская, Г.П. Календарь прививок – ошибка медицины XX века. Основы вакцинологии. – М.: Волшебный ребенок, 2008. – 464 с.
5. Челнакова, И.В. Биохимические механизмы нейротоксических реакций на антибактериальные препараты у больных туберкулезом легких // Проблемы туберкулеза. – 1992. - №1-2. – С. 23-25.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2005. – 405 с.
7. Научно-практическая конференция «Производство противотуберкулезных лекарственных препаратов в Российской Федерации. Реалии и перспективы». Проблемы туберкулеза и болезни легких. – 2005. - №8. – С. 60-62.

TO THE PROBLEM OF PRECLINICAL RESEARCH OF THE MODERN MULTICOMPONENT ANTITUBERCULAR PREPARATIONS, WHICH ARE CONTAINING AND NOT CONTAINING VITAMIN B₆

© 2009 K.I. Usov¹, G.G. Yushkov¹, A.A. Guschina¹, A.S. Guschin²

¹ Scientific Research Institute for Biophysics, Angarsk State Technical Academy

² Open Society "Pharmasyntez"

Article is received 2009/10/08

Last time in modern antitubercular preparations began to include pyridoxine hydrochloride. Therefore there was a need in preclinical research of the given medicinal forms in comparative aspect. With this purpose we has been lead comparative preclinical research of two medicinal forms: «Protubetam» and «Protubetam B₆» on biochemical parameters.

Key words: antitubercular preparations, pyridoxine hydrochloride, biochemical parameters

Konstantin Usov, Graduate Student. E-mail: chemist545@mail.ru

Gennadiy Yushkov, Candidate of Medicine, Professor, Senior Research Fellow. E-mail: priroda@ang.ru

Alla Guschina, Laboratory Manager

Alexander Guschin, Director of Open Society "Pharmasyntez". E-mail: info@pharmasyntez.com