

ВЛИЯНИЕ САХАРОЗЫ И ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА НА ТОКСИЧНОСТЬ ИЗОНИАЗИДА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

К.И. Усов^{1,2}, Т.А. Гуськова³, Г.Г. Юшков¹, А.А. Гущина¹

INFLUENCE OF SUCROSE AND PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE ON THE TOXICITY OF ISONIAZID IN CONDITIONS OF ACUTE EXPERIMENT

K.I. Usov, T.A. Guskova, G.G. Yushkov, A.A. Gushchina

Статья содержит результаты экспериментальных токсикологических исследований чувствительности крыс к летальным дозам противотуберкулезного препарата «Изониазид» в условиях его сочетанного применения с сахарным сиропом и пиридоксина гидрохлоридом, а также после предварительного потребления подслащенной питьевой воды. Было установлено, что применение изониазида с сахаром позволило снизить токсичность изониазида и увеличить среднюю продолжительность жизни подопытных крыс.

Ключевые слова: летальность, выживаемость, средняя продолжительность жизни, токсичность, изониазид, противотуберкулезный препарат, глюкоза, сахароза, передозировка

The article contains the results of experimental Toxicological studies of the sensitivity of rats to lethal doses of the TB drug «Isoniazid» in conditions of its combined use with sugar syrup and pyridoxine hydrochloride, as well as after the preliminary consumption of sweetened drinking water. It was found that the use of isoniazid with sugar reduced the toxicity of isoniazid and increase the average life expectancy of rats.

Key words: mortality, survival, life expectancy, toxicity, isoniazid, TB drug, glucose, sugar syrup, overdose

Введение

Для лечения любых форм туберкулеза, в том числе и для целей фармакопрофилактики туберкулеза, уже более 60 лет фтизиатры применяют противотуберкулезный препарат первого ряда – изониазид. Применение изониазида длительное и сочетается с другими противотуберкулезными препаратами, что оказывает существенную лекарственную нагрузку на организм человека, увеличивая частоту проявлений нежелательных реакций [7].

Судороги как нежелательная реакция организма, вызванная приемом изониазида, были установлены экспериментально, при проведении токсикологических исследований изониазида на животных [5, 6], также описаны [8] клинические случаи развития судорог у пациентов с гиперчувствительностью к изониазиду при его приеме в терапевтических дозах и при преднамеренной передозировке препаратом. Иницированная приемом изониазида симптоматическая эпилепсия гипотетически может приводить к быстрому формированию

энергетико-метаболического синдрома в направлении повышения потребности клеток в простых углеводах, прежде всего в обменных процессах нервных клеток, что и делает актуальным настоящее исследование, посвященное определению влияния сахарозы на токсичность изониазида.

Из истории борьбы с туберкулезом в дореволюционной России [2, 9] и медицинских руководств того времени известно, что для лечения чахотки в качестве подручных средств больному давали исландский мох, сваренный в молоке с сахаром, по полчашки каждые два-три часа, а также семена водяного укропа – три-четыре раза в день в порошках с сахаром. В современной научной литературе упоминаний об использовании сахара для лечения туберкулеза не найдено.

Цель исследования

Изучить влияние сахарозы на токсичность изониазида и пиридоксина в условиях острого токсикологического эксперимента.

¹ НИИ биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет».

² ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России», кафедра фармакологии.

³ ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского», Центр трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использованы нелинейные крысы-самцы с массой тела 210–230 граммов. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (ветеринарное удостоверение 238 № 0019883). Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями по работе с экспериментальными животными и разрешены локальным этическим комитетом [4, 5].

В экспериментах использовали препарат Изониазид® производства ОАО «Московское производственное химико-фармацевтическое объединение им. Н.А. Семашко», г. Москва (таблетки 0,3 г) и субстанцию пиридоксина гидрохлорида производства ДСМ «Нутришн Продактс ГмбХ» (Германия); сахарозу безводную в виде порошка (ООО «Волга-хим», г. Волгоград). Все вещества животным вводили однократно, внутривенно, в виде суспензии в дистиллированной воде, с помощью металлического атравматичного зонда [6].

Измерение уровня глюкозы крови (в ммоль/л) проводили животным с 10 часов утра. До проведения эксперимента накануне вечером с 19 часов животных лишали корма, оставляя лишь свободный доступ к воде. Для определения индивидуального показателя уровня глюкозы в периферической крови использовали экспресс-анализатор «Акку-Чек» (Германия). Содержание гликогена в гомогенизированных тканях печени и скелетных мышцах крыс определяли микрометодом [1] с

последующим определением оптической плотности на спектрофотометре СФ-26 (Россия). Количество животных в группе определяли согласно принципам рандомизации и необходимой достаточности для проведения анализа стохастических данных определяемых показателей в условиях токсикологического эксперимента. Для обработки полученных результатов применяли методы математической статистики, реализованные в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2010, входящем в состав лицензионного пакета офисных приложений для комплексной обработки данных Microsoft Office 2010 (Microsoft Co., США; правообладатель лицензии – ФГБОУ ВПО «Ангарский государственный технический университет»). Вычисляли среднее арифметическое значение ($\bar{M}$), стандартную ошибку среднего арифметического значения (m), достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$, производили оценку значимости различий средних величин по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты определения содержания глюкозы в периферической крови подопытных крыс при пероральном введении им изониазида в дозе 1200 мг/кг ($DL_{50} = 1233 \pm 43$ мг/кг [5, 6]), изониазида с пиридоксина гидрохлоридом, изониазида с сахарным сиропом представлены в таблице 1. Дозы пиридоксина гидрохлорида и сахарозы были в весовом отношении равны DL_{50} изониазида.

Таблица 1. Динамика содержания глюкозы в периферической крови крыс-самцов после однократного перорального введения изониазида, изониазида с пиридоксина гидрохлоридом и изониазида с сахарным сиропом ($n = 80$)

Дозы препаратов	Глюкоза, ммоль/л					Коэффициент достоверности (t)
	№ 1	После введения препаратов				
		№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	
1200 мг/кг изониазид	3,9 ± 1,2	10,3 ± 2,6*	21,0 ± 2,3* (↑)	7,2 ± 2,1	1,4 ± 0,6 (↓)	t ₁₋₂ = 2,3 t ₁₋₃ = 6,6 t ₃₋₄ = 4,6 t ₃₋₅ = 8,2
1200 мг/кг изониазид + 1200 мг/кг пиридоксина гидрохлорид	4,3 ± 0,9	10,8 ± 3,1*	19,1 ± 1,2* (↑)	3,4 ± 2,6	1,8 ± 0,8* (↓)	t ₁₋₂ = 2,0 t ₁₋₃ = 9,9 t ₃₋₄ = 5,5 t ₃₋₅ = 12,0
1200 мг/кг изониазид + сахарный сироп (1200 мг/кг сахарозы)	3,3 ± 1,3	20,2 ± 2,4* (↑)	22,2 ± 3,1* (↑)	10,9 ± 2,9*	6,8 ± 1,3 [#]	t ₁₋₂ = 6,3 t ₁₋₃ = 5,6 t ₃₋₄ = 2,8 t ₃₋₅ = 4,6
1200 мг/кг сахароза (контрольная группа ^{##})	4,4 ± 1,2	8,4 ± 1,4*	6,5 ± 1,9	5,1 ± 1,3	3,5 ± 1,0	t ₁₋₂ = 2,2 t ₁₋₃ = 0,4 t ₂₋₄ = 1,7 t ₂₋₅ = 2,8

Примечания: * – различия статистически достоверны ($p \leq 0,05$) по отношению к контрольному измерению № 1;

(↑) – гипергликемия;

(↓) – гипогликемия;

[#] – измерение уровня глюкозы через 3 часа после введения изониазида с сахарным сиропом, выживаемость подопытных крыс составила 100%;

^{##} – в контрольной группе крыс судороги отсутствовали, уровень глюкозы крови измеряли каждые 30 мин после введения сахарозы.

Таблица 2. Содержание гликогена в гомогенизированных тканях печени и скелетных мышц крыс после полного купирования судорожного синдрома (n = 50)

Дозы вводимых препаратов	Тяжесть судорог (баллы)	Продолжительность судорожного синдрома* 00:00 – часы, минуты (M ± m)	Гликоген, мкмоль/г	
			Печень	Скелетная мышца
1200 мг/кг изониазид	5	00:26 ± 4 мин	34,0 ± 1,9*	6,5 ± 0,3*
1200 мг/кг изониазид + 1200 мг/кг пиридоксина гидрохлорид	2	01:12 ± 19 мин	49,6 ± 2,8*	8,1 ± 0,4*
1200 мг/кг изониазид + сахарный сироп (1200 мг/кг сахарозы)	1	02:03 ± 5 мин	80,2 ± 3,1*	10,1 ± 0,7
1200 мг/кг сахароза (контрольная группа)	0	отсутствие судорог	104,1 ± 2,9	12,1 ± 1,5
Фоновый контроль – интактная группа крыс			100,8 ± 3,5	11,3 ± 0,9

Примечания: # – продолжительность судорожного синдрома (фаза двигательного возбуждения [б]) – промежуток времени от момента первого симптоматического проявления судорог до их полного самопроизвольного прекращения или наступления биологической смерти подопытного животного;

* – отличие статистически достоверное при $p \leq 0,05$ по сравнению с величинами показателей, полученных у группы фонового контроля.

Динамика уровней глюкозы крови у подопытных групп крыс с введением им DL₅₀ изониазида и изониазида с пиридоксина гидрохлоридом имела однонаправленный характер изменений и проявлялась повышением концентрации глюкозы, развитием гипергликемии с последующим ее быстрым снижением и развитием гипогликемии с переходом в состояние гипогликемической комы. У интактных крыс уровень глюкозы крови находился в пределах от 3,1 до 5,4 ммоль/л, что согласуется с данными [3] о физиологической норме диапазона концентрации глюкозы в крови у лабораторных крыс. В 30% случаев наступление биологической смерти подопытных крыс происходило в состоянии гипогликемической комы, вызванной введением изониазида, в остальных случаях смерть наступала в состоянии судорог, оцениваемых в 5 баллов по шкале Мареша [6]. О коматозном состоянии крыс судили по отсутствию реф-

лкторных реакций животного на наносимые звуковые и болевые раздражения, при этом глазные щели крыс были закрыты, дыхание определялось визуально (наличие глубоких дыхательных движений), уровень глюкозы крови был минимален (табл. 1, измерение № 5). Тяжесть и продолжительность судорог, эпистатуса были определяющими в развитии лекарственно-индуцированной гепато- и миогликопении (табл. 2).

В подопытной группе крыс с введением изониазида с сахаром гипергликемия не сменялась развитием гипогликемии, наблюдали лишь снижение уровня глюкозы до диапазонов физиологической нормы (5,8 ± 1,4 ммоль/л – в опытной группе, через 4 часа после введения препаратов, 4,6 ± 1,6 ммоль/л – в интактной контрольной группе). Было установлено, что опасность наступления биологической смерти и развитие гипогликемической комы могут возникнуть не только при критически

Таблица 3. Летальность, выживаемость, тяжесть судорог, средняя продолжительность жизни крыс (СПЖ) после введения изониазида, пиридоксина гидрохлорида и сахарозы в условиях острого опыта с учетом продолжительности пищевой депривации крыс (n = 210)

Дозы вводимых препаратов	Летальность#	Выживаемость (%)	Тяжесть судорог (баллы)	СПЖ**, 00:00 – часы, минуты (M ± m)
1200 мг/кг изониазид*	15/30	50,0	5	00:42 ± 9 мин (1)
1200 мг/кг изониазид**	8/30	73,3	3	03:19 ± 21 мин (2)
1200 мг/кг изониазид + 1200 мг/кг пиридоксина гидрохлорид*	7/30	76,7	2	02:33 ± 17 мин (3)
1200 мг/кг изониазид + 1200 мг/кг пиридоксина гидрохлорид**	3/30	90,0	1	07:42 ± 108 мин (4)
1200 мг/кг изониазид + сахарный сироп (1200 мг/кг сахарозы)*	0/30	100,0	1	отсутствие летальности
1200 мг/кг изониазид + сахарный сироп (1200 мг/кг сахарозы)**	0/30	100,0	0	отсутствие летальности
Коэффициент достоверности между подопытными группами (t)				t ₁₋₂ = 6,9; t ₃₋₄ = 2,8

Примечания: * – лишение корма животных за 14 час до введения препаратов;

** – лишение корма животных за 1 час до введения препаратов;

– в числителе указано число погибших животных, в знаменателе – общее количество животных в группе,

** – СПЖ – средняя продолжительность жизни погибших крыс после введения среднесмертельной дозы изониазида.

низком количестве глюкозы в крови, но и при резком скачке исследуемого показателя при переходе из состояния гипергликемии в состояние гипогликемии. Тяжесть проявления судорог у подопытных крыс, получавших изониазид с сахаром, была равна 1 баллу по шкале Мареша [6], а выживаемость крыс составила 100%.

Введение крысам только пиридоксина гидрохлорида (в дозе 1200 мг/кг) не приводило к статистически значимому изменению уровня глюкозы крови, а также к изменению уровня гликогена в печени и скелетных мышцах по сравнению с данными, полученными в контрольной группе интактных крыс, что свидетельствовало об отсутствии влияния пиридоксина гидрохлорида в исследуемой дозе на уровень глюкозы в крови.

Применение изониазида с сахарным сиропом, изониазида с пиридоксина гидрохлоридом (в дозе 1200 мг/кг), а также в дозах, в весовом отношении равных DL_{50} изониазида, приводило к снижению чувствительности животных к изониазиду, что проявлялось отсутствием гибели крыс (для группы, получавшей изониазид с сахарным сиропом) и повышением процента выживаемости до 77% при введении препаратов крысам на фоне длительной пищевой депривации (лишение корма за 14 часов до введения препаратов) и до 90% – при введении препаратов через 1 час после последнего приема корма (для подопытной группы крыс, получавшей изониазид с пиридоксина гидрохлоридом в дозе 1200 мг/кг), снижением тяжести судорог и увеличением средней продолжительности жизни подопытных крыс (табл. 3).

Введение препаратов на голодный желудок приводило к большей их токсичности, по сравнению с введением препаратов подопытным крысам, лишенным корма за 1 час до их введения (табл. 3). Введение изониазида на голодный желудок приводило к сокращению средней продолжительности жизни подопытных крыс на 79%, а при введении в тех же условиях изониазида с пиридоксином этот показатель был равен 67%. Применение изониазида с сахарным сиропом приводило к 100% выживаемости подопытных крыс независимо от продолжительности голодания животных. Одиночные миоклонические спазмы, вздрагивание ушей, головы (1 балл по шкале

тяжести судорог [6]) визуально определяли только у подопытных крыс, получавших изониазид с сахаром после 14-часовой пищевой депривации (табл. 3).

Введение подопытным крысам летальных доз изониазида с сахаром позволило повысить среднесмертельную дозу изониазида [5], установленную ранее при введении изониазида без сахара, на 37% (изониазид + сахароза) и на 61% (изониазид + пиридоксина гидрохлорид + сахароза).

Таким образом, проведенные исследования установили динамику перехода уровня глюкозы в крови крыс, получивших токсическую дозу изониазида от физиологической нормы к развитию гипергликемии с последующим переходом в состояние гипогликемии.

Развитие гипергликемии при применении изониазида в летальных дозах согласуется с концепцией о «стресс-индуцированной гипергликемии», согласно которой гипергликемия рассматривается как неизбежный патологический процесс критических состояний и представляет одну из наиболее актуальных проблем современной интенсивной медицины. Результаты исследований позволили отнести выявленную гипогликемию к тяжелому побочному эффекту, проявляющемуся вследствие инициированного лекарственного стресса при моделировании передозировки изониазидом в условиях острого опыта. Быстроразвивающаяся гипогликемия на фоне приема изониазида, введенного в среднесмертельной дозе, является определяющей причиной наступления биологической смерти или наступления комы, в последующем приводящей к гибели подопытного животного.

Выводы

1. Применение сахарозы совместно с изониазидом и пиридоксина гидрохлоридом приводит к снижению токсичности указанных препаратов.
2. Прием препаратов после еды улучшает их переносимость.
3. Установленные факты могут способствовать уменьшению побочных эффектов противотуберкулезных препаратов, что в свою очередь позволит повысить эффективность химиотерапии туберкулеза легких.

Литература

1. Акимов П.А., Орбиданс А.Г., Терёхин Г.А., Терёхина Н.А. Влияние острой алкогольной интоксикации на содержание гликогена в печени и скелетных мышцах // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 2. – С. 15-17.
2. Каганович Р.Б. Из истории борьбы с туберкулезом в дореволюционной России. – М.: Изд-во Академии медицинских наук, 1952. – 318 с.
3. Кизель Т.В. Показатели биологической нормы лабораторных крыс. В кн. Показатели биологической нормы лабораторных животных (крыс.). – Ростов-на-Дону: РГМУ, 1978. – С. 72-73.
4. Усов К.И. Изучение побочных реакций препаратов изониазида и возможность их коррекции с помощью пиридоксина гидрохлорида: дис. ... канд. биол. наук: 14.03.06. – Белгород, 2012 – 137 с.
5. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г. Чувствительность животных различных возрастных групп к изониазиду в условиях токсикологического эксперимента // Токсикологический вестник. – 2016. – № 5. – С. 36-43.
6. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г. Развитие токсикологической толерантности к изониазиду в условиях эксперимента // Токсикологический вестник. – 2017. – № 2. – С. 2-11.

7. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – М.: «Российское общество фтизиатров», 2015. – 52 с.
8. Martinjak-Dvorsek I., Gorjup V., Horvat M., Noc M. Acute isoniazid neurotoxicity during preventive therapy // Crit. Care. Med. – 2000. – Vol. 28. – N. 2. – P. 567-568.
9. Rothman Sh.M. Living in the shadow of death: tuberculosis and the social experience of illness in American history. – N. Y.: Basic Books, 1994. – 319 p.

Сведения об авторах

Усов Константин Ильич – заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований НИИ биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», кандидат биологических наук, доцент

Адрес: 665835, Иркутская обл., г. Ангарск, ул. Партизанская, д. 2

Тел. + 7 (983) 404-26-26

e-mail: konstausov@yandex.ru

Гуськова Татьяна Анатольевна – ведущий научный сотрудник отдела доклинических исследований Центра трансфера фармацевтических технологий имени М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского», заслуженный деятель науки Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Адрес: 150010, г. Ярославль, ул. Технопарковая, д. 11/2

Тел. + 7 (910) 454-09-92

e-mail: tagus@rambler.ru

Юшков Геннадий Георгиевич – старший научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований НИИ биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», кандидат медицинских наук, доцент

Адрес: 665835, Иркутская обл., г. Ангарск, ул. Партизанская, д. 2

Тел. + 7 (989) 085-32-42

e-mail: prof_ushkov@mail.ru .

Гущина Алла Анатольевна – главный биолог-исследователь лаборатории токсикологических испытаний и исследований НИИ биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет»

Адрес: 665835, Иркутская обл., г. Ангарск, ул. Партизанская, д. 2

Тел. + 7 (902) 567-36-35

e-mail: alla_gushchina@bk.ru