

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО И НЕ СОДЕРЖАЩЕГО ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИД

К.И. Усов

к.б.н., доцент, зав. лабораторией токсикологических испытаний и исследований, ИЛЦ НИИ биофизики, Ангарский государственный технический университет; кафедра фармакологии, Иркутский государственный медицинский университет
E-mail: konstausov@yandex.ru

Т.А. Гуськова

д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зам. Председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества» (Москва)

Г.Г. Юшков

к.м.н., доцент, науч. сотрудник, лаборатория токсикологических испытаний и исследований, ИЛЦ НИИ биофизики, Ангарский государственный технический университет

А.В. Машанов

к.б.н., науч. сотрудник, лаборатория токсикологических испытаний и исследований, ИЛЦ НИИ биофизики, Ангарский государственный технический университет

Представлены результаты сравнительного экспериментального токсикологического исследования современных комбинированных противотуберкулезных препаратов в составе единой лекарственной формы: изониазид, пиперазинид, рифампицин, этамбутола гидрохлорид, отличающихся по наличию в составе пиридоксина гидрохлорида (витамина В₆). Установлен факт снижения токсичности при введении препарата, содержащего пиридоксина гидрохлорид, по отношению к препарату без пиридоксина гидрохлорида.

Ключевые слова: острая токсичность, среднесмертельная доза, комбинированный противотуберкулезный препарат, изониазид, пиперазинид, рифампицин, этамбутол, рациональная химиотерапия, пиридоксина гидрохлорид, витамин В₆, экспериментальные исследования.

Современный режим химиотерапии туберкулеза должен включать не менее двух препаратов, к которым микобактерии (*Mycobacterium tuberculosis*) сохраняют чувствительность [1]. В противном случае весьма вероятен неудачный исход лечения из-за развития лекарственной устойчивости. В последнее время фтизиатры отмечают развитие мультирезистентности возбудителя туберкулеза к противотуберкулезным препаратам (ПТП) [2], а также остро прогрессирующее течение туберкулеза, что является показанием вынужденного перехода на режим химиотерапии с применением комбинированных препаратов, содержащих от двух до шести активных веществ в составе единой лекарственной формы комбинированных ПТП.

Использование комбинированных противотуберкулезных лекарственных средств в одной лекарственной форме предполагает оптимальное и максимально эффективное сочетание лечебных свойств препарата с минимальными токсическими

проявлениями в процессе химиотерапии. Длительность химиотерапии комбинированными ПТП составляет, как правило, до трех месяцев ежедневного приема [3], что может стать фактором проявления побочных реакций, в том числе токсического характера.

Определение токсичности каждого из активных веществ в составе комбинированных ПТП в отдельности сопряжено с определенными трудностями, поскольку дозирование препарата осуществляется обычно по активному веществу, обладающему наибольшей токсичностью, или по количеству активного вещества, выбирая максимальное. Известно, что если два препарата или более назначаются одновременно, то синергизм или антагонизм их взаимодействия как друг с другом, так и с макроорганизмом почти невозможно полностью приписать какому-либо одному из них. Эта проблема существенно усложняется, когда объектом токсикологического исследования без-

опасности являются комбинированные ПТП, содержащие несколько активных веществ в виде единой лекарственной формы.

Были исследованы современные комбинированные ПТП в таблетированной лекарственной форме с фиксированными дозами активных веществ в таблетке – «Протуб-4» (без пиридоксина гидрохлорида), содержащий следующие активные вещества в таблетке: изониазид (75 мг), рифампицин (150 мг), пиразинамид (400 мг), этамбутола гидрохлорид (275 мг), и ПТП «Протуб-4 плюс» (с пиридоксина гидрохлоридом), содержащий активные вещества: изониазид (75 мг), рифампицин (150 мг), пиразинамид (400 мг), этамбутола гидрохлорид (275 мг) и пиридоксина гидрохлорид (10 мг), производства ОАО «Фармасинтез» (г. Иркутск). Включение пиридоксина гидрохлорида (витамина В₆) в состав препарата «Протуб-4 плюс», обусловлено тем, что входящий в состав препарата изониазид обладает нейротоксическим действием [4], что может приводить к развитию побочных реакций со стороны нервной системы, особенно у пациентов из группы риска (эпилепсия и другие заболевания нервной системы, «медленные» ацетиляторы у пациентов с неполноценным питанием, ведущим к дефициту массы тела, период беременности, алкоголизм, сахарный диабет, тяжелые психозы, уремия, ВИЧ-инфекция) [4–7]. Для фармакологической коррекции возможных побочных реакций токсического характера на ПТП, содержащие изониазид, применяют пиридоксина гидрохлорид (витамин В₆) [5, 7]. Из экспериментальных данных и данных судебно-медицинских экспертиз известно, что применение изониазида в токсических дозах приводит к снижению синтеза тормозного нейромедиатора – ГАМК путем ингибирования пиридоксальфосфат-зависимого фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты и как следствие этого – к повышению рефлекторной возбудимости на свет, звук, развитию генерализованных клонико-тонических судорог [8].

Токсикологических данных по препаратам «Протуб-4», «Протуб-4 плюс» в литературе не найдено, но имеются материалы о передозировке и побочных эффектах, свойственных каждому активному веществу («изолированный» подход к оценке безопасности препарата), входящему в состав ПТП, без учета возможного комбинированного действия изониазида, рифампицина, пиразинамида, этамбутола гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида, находящихся в составе одной из лекарственных форм изучаемых препаратов.

Цель работы – оценить роль пиридоксина гидрохлорида в снижении токсичности при остром отравлении современным комбинированным ПТП, содержащим («Протуб-4 плюс») и не содержащим («Протуб-4») пиридоксина гидрохлорид.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с действующими нормативными документами и методическими рекомендациями, принятыми на территории РФ для проведения экспериментальных токсикологических исследований, а также на основе многолетнего экспериментального опыта сотрудников лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ биофизики Ангарского государственного технического университета (АнГТУ) по изучению противотуберкулезных препаратов в качестве экспериментально-биологической модели были выбраны половозрелые белые нелинейные крысы (самцы, самки) [9, 10]. Критериями включения животных в эксперимент являлись: заключение Службы ветеринарии Иркутской области, отсутствие видимых проявлений заболеваний, однородность по массе тела, в ряде случаев – по анализу периферической крови и некоторым другим показателям в соответствии с принятыми в лаборатории стандартными операционными процедурами и паспортом состояния лабораторных животных. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (вивария) (ветеринарное удостоверение 238 № 0019817).

Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями по работе с экспериментальными животными, изложенными в следующих нормативно-правовых документах: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), «Правила лабораторной практики» (приложение к приказу МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.), и разрешены локальным этическим комитетом.

Параметры острой токсичности устанавливали по методу Кербера [11], на белых крысах массой 180–200 г, рандомизированных на группы: получавшие ПТП без пиридоксина гидрохлорида и ПТП, содержащий пиридоксина гидрохлорид. Рандомизацию крыс на группы также проводили по принципу диапазона доз и полу. Каждая группа состояла из 12 крыс ($n = 6$ самцов (М), $n = 6$ самок (F)) и представляла отдельную серию эксперимента.

Препараты «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» (ОАО «Фармасинтез», г. Иркутск) испытывали в дозах от 6000 до 16000 мг/кг с шагом наращивания дозы 1000 мг. Животным вводили препарат однократно, внутривенно в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью металлического атравматичного зонда. Дозирование проводили по количеству изониазида в таблетке. Перед введением препарата таблетки растирались в ступке. Однократный объем вводимой суспензии для крыс не превышал 5 мл [12]. Препарат вводили дробно в течение 6 ч, начиная с 9 ч утра. Дробное введение представляло собой введение смертельной дозы (DL_{50}) исследуемых препаратов, разделенное на шесть этапов, на каждый из которых приходилось по $1/6 DL_{50}$. Интервал между введениями составлял 1 ч. В течение всего периода дробного введения препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» до достижения DL_{50} и после его завершения визуально оценивали особенности поведения крыс, определяли время латентного периода (время до наступления судорог), проявления эпистатуса и продолжительность нахождения крыс в коме. Тяжесть судорог оценивали по пятибалльной шкале Мареша [13]. Определяли среднюю продолжительность жизни погибших крыс. Число крыс в каждой группе составляло $n = 30$ М, $n = 30$ F. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 14 суток [10].

На 2-е сутки с момента введения препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» в дозе DL_{50} в параллельных опытных и контрольных группах регистрировали следующие показатели общего состояния животных: внешний вид, выделения из естественных отверстий, наличие определяемых уплотнений – пальпаторно, массу тела в граммах, суточное потребление и выделение воды (диурез) в миллилитрах. Моча собиралась в обменные клетки («Simax», Чехия).

На 3-и сутки в параллельных опытных и контрольных группах, от момента введения DL_{50} препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» регистрировали гематологические и биохимические показатели крови, которые определяли на биохимических анализаторах FP-901M («Labsystems», Финляндия) и «EuroLyser» (EUROLab, Instruments GmbH; Австрия), гематологическом анализаторе Hemolux-19 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd; Китай) с использованием стандартных наборов реактивов согласно приложенным к ним инструкциям; определяли ксантуреновую кислоту в суточной моче крыс как биомаркер измененного обмена

триптофана при применении ПТП, содержащих изониазид, по методике [14]; в моче крыс определяли качественно изониазид [15]. Число крыс в каждой группе составляло $n = 10$ М, $n = 10$ F.

Для обработки полученных результатов применяли методы математической статистики, реализованные в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007, входящем в состав лицензионного пакета офисных приложений для комплексной обработки данных Microsoft Office 2007 («Microsoft Co.», США); правообладатель лицензии АнГТУ.

Вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартную ошибку среднего арифметического значения (m). Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$. Методики расчета показателей соответствуют общепринятым, изложенным в руководстве по математической статистике для медико-биологических исследований [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные токсикометрии острого отравления при введении препарата «Протуб-4 плюс» и препарата «Протуб-4» без пиридоксина гидрохлорида приведены в табл. 1.

Таблица 1. Среднесмертельные и смертельные дозы препарата «Протуб-4 плюс» и препарата «Протуб-4» ($n = 6$)

Исследуемый ПТП	DL_{50} , г/кг		DL_{100} , г/кг	
	Пол		Пол	
	М	F	М	F
«Протуб-4»	9,9±0,69	9,3±0,69	13	13
«Протуб-4 плюс»	13,8±0,38	13,2±0,49	16	16
Коэффициент достоверности (t)	4,9	4,6	–	–

При сравнении установленных величин DL_{50} (табл. 1), коэффициент достоверности $t \geq 2$, что соответствует вероятности безошибочного прогноза, равной или более 95% ($p > 0,05$), следовательно, различия можно считать статистически достоверными. Процентное повышение DL_{50} при введении препарата «Протуб-4 плюс» от DL_{50} при введении препарата «Протуб-4» для крыс М составило 39%, для крыс F – 42 %. Из данных, представленных в табл. 1, следует, что при введении исследуемых препаратов величина DL_{100} , характерная для введения препарата «Протуб-4», сместилась в сторону DL_{50} препарата «Протуб-4 плюс», что свидетельствует о лучшей переносимости препарата, содержащего пиридоксина гидрохлорид и о достоверно-

сти факта снижения токсичности препарата «Протуб-4 плюс» в условиях однократного перорального введения крысам.

Непосредственно после 2–3-го дробного введения ПТП животные находились в состоянии тревоги, «втягивали» воздух, «умывались», затем забивались в угол клетки, сидели неподвижно, затаивались. Глазные щели крыс были сужены. Проявляемая симптоматика оценивалась по шкале Мареша в 0,5 балла. Через 3–4 ч после дробного введения исследуемых ПТП в установленных среднесмертельных дозах у крыс наблюдались одиночные миоклонические спазмы, вздрагивания ушей и головы, быстро переходящие в слабые вздрагивания всего тела, что соответствовало 2 баллам судорожной активности по шкале Мареша.

Вскоре после окончания дробного введения исследуемых ПТП в 50% случаев формировался эпилептический статус при введении препарата «Протуб-4» и значительно реже – при введении препарата «Протуб-4 плюс» (табл. 2), судорожная активность оценена по шкале Мареша в 4 балла. Судороги четвертой стадии имели циклическую смену чередова-

ния с более слабыми судорожными пароксизмами, оцениваемыми в 3 балла.

В последующем дыхание крыс становилось учащенным, поверхностным (при дозе 8000–12000 мг/кг), все животные теряли контроль позы и занимали боковое положение, реакция на внешние раздражители отсутствовала, и в таком состоянии крысы впадали в состояние комы (табл. 2).

Латентный период наступления эпилептического статуса у крыс М, получавших препарат «Протуб-4 плюс», имел достоверную тенденцию к увеличению по сравнению с величинами этого показателя у крыс, получавших препарат без пиридоксина гидрохлорида. Средняя продолжительность эпилептического статуса и продолжительность нахождения в коме были достоверно короче в группах крыс, получавших препарат с фиксированной дозой пиридоксина гидрохлорида в составе ПТП «Протуб-4 плюс», по отношению к препарату ПТП «Протуб-4». Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют о нейропротекторной защите ЦНС с помощью включенного в состав ПТП «Протуб-4 плюс» пиридоксина гидрохлорида.

Таблица 2. Динамика развития судорожного синдрома и комы у крыс при и после окончания введения ПТП «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» в установленных среднесмертельных дозах (n = 30)

Показатель	«Протуб-4»		«Протуб-4 плюс»		Коэффициент достоверности, <i>t</i>
	Пол		Пол		
	М (1)	Ф (3)	М (2)	Ф (4)	
Латентный период, мин	50,9 ± 2,1	53,0 ± 2,2	58,1 ± 2,4	55,1 ± 1,5	<i>t</i> ₁₋₂ = 2,3; <i>t</i> ₃₋₄ = 0,8*
Продолжительность эпилептического статуса до наступления комы, мин	55,1 ± 2,5	63,4 ± 4,9	35,6 ± 2,3	32,1 ± 3,0	<i>t</i> ₁₋₂ = 5,7; <i>t</i> ₃₋₄ = 5,4
Проявление эпилептического статуса, %	53	50	33	37	–
Продолжительность комы, ч	6,39 ± 0,2	5,96 ± 0,3	4,02 ± 0,3	4,2 ± 0,1	<i>t</i> ₁₋₂ = 6,5; <i>t</i> ₃₋₄ = 5,5
Летальность без выхождения из комы, %	17	20	10	7	–

Примечание: * – различия статистически недостоверны при *p* > 0,05.

Таблица 3. Средняя продолжительность жизни крыс (00:00 – часы, минуты) после однократного введения препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» в дозах DL₅₀ и DL₁₀₀ (n = 30)

Препарат	DL ₅₀ , мг/кг		DL ₁₀₀ , мг/кг	
	Пол		Пол	
	М	Ф	М	Ф
«Протуб-4»	56:50 ± 3,5	47:30 ± 5,2	30:22 ± 4,1	34:50 ± 5,2
«Протуб-4 плюс»	67:10 ± 3,3	65:13 ± 4,3	48:10 ± 3,8	47:15 ± 2,9
Коэффициент достоверности (<i>t</i>)	2,2	2,7	3,2	2,1

После выхода из комы отмечалась положительная динамика, и на следующие сутки некоторые крысы начинали принимать корм, подходить к поилке, хотя и реагировали на внешние раздражители заторможенно. Моча и кал животных были окрашены в красный цвет (за счет рифампицина). Следует отметить наличие жидких испражнений. На 3–4-е сутки подопытные животные по внешнему виду практически не отличались от контрольных, хотя еще сохранялась визуально определяемая заторможенность в поведении, а также диарея.

Средняя продолжительность жизни крыс представлена в табл. 3 (срок наблюдения – 14 суток, 00:00 – часы, минуты). У крыс, получавших препарат, содержащий пиридоксина гидрохлорид («Протуб-4 плюс»), продолжительность жизни имела статистически достоверную тенденцию к увеличению.

Гибель 80–90% крыс, получавших DL₅₀ ПТП «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс», наступала на 2–3-и сутки. Согласно данным патоморфологического исследования, гибель крыс при остром отравлении препаратами происходила на фоне генерализован-

ного нарушения гемодинамики. При проведении некропсии павших животных выявлены гемодинамические расстройства, геморрагические очаги в легких: в желудке и кишечнике обнаружено оранжево-окрашенное содержимое; в легких – небольшие участки кровоизлияний; печень вишневого цвета, умеренно полнокровная; очаги некроза в корковом слое почек.

Результаты, полученные на 14-е сутки от введения препаратов, свидетельствовали о практически полном, визуально определяемом восстановлении. Изменение массы тела крыс, суточного потребления воды и суточного диуреза крысами при введении DL₅₀ препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» на 2-е сутки обследования представлены в табл. 4.

На 2-е сутки после введения DL₅₀ препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» у животных наблюдалось статистически достоверное «водное» голодание, суточный диурез был усилен. В опытных группах у крыс отмечалось выделение жидких каловых масс, на фоне значительного снижения потребления пищи и воды прослеживалось снижение массы тела (табл. 4).

Таблица 4. Изменение массы тела, суточного потребления воды и суточного диуреза у крыс на 2-е сутки обследования после введения DL₅₀ препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» (n = 10)

Показатель	Пол	Контроль (1)	«Протуб-4» (2)	«Протуб-4 плюс» (3)	Коэффициент достоверности (t)
Масса тела, г	М	172,4 ± 0,5	158,2 ± 0,7	163,4 ± 0,6	t ₁₋₂ = 16,5; t ₁₋₃ = 11,5; t ₂₋₃ = 6,6
	F	169,3 ± 0,5	155,7 ± 0,8	161,6 ± 0,7	t ₁₋₂ = 14,4; t ₁₋₃ = 9,0; t ₂₋₃ = 5,6
Потребление воды за 24 ч, мл	М	20,1 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,1 ± 0,1	t ₁₋₂ = 84,1; t ₁₋₃ = 84,9; t ₂₋₃ = 0,7*
	F	20,1 ± 0,1	8,1 ± 0,1	7,8 ± 0,1	t ₁₋₂ = 84,9; t ₁₋₃ = 87,0; t ₂₋₃ = 2,1.
Выделение мочи (диурез) за 24 ч, мл	М	8,4 ± 0,7	16,9 ± 0,8	15,2 ± 1,1	t ₁₋₂ = 8,0; t ₁₋₃ = 5,2; t ₂₋₃ = 1,2*
	F	7,4 ± 0,4	18,2 ± 1,0	17,9 ± 0,2	t ₁₋₂ = 10,0; t ₁₋₃ = 23,5; t ₂₋₃ = 0,3*

Примечание: * – различия статистически недостоверны при p > 0,05.

В табл. 5 приведены результаты гематологических исследований у крыс на 3-и сутки после введения DL_{50} сравниваемых препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба препарата вызывали изменения показателей красной и белой крови по сравнению с контролем. Так, у животных обеих опытных групп возрастало количество гемоглобина, эритроцитов, а у животных, получавших препарат без пиридоксина гидрохлорида («Протуб-4»), отмечалось более интенсивное снижение количества ретикулоцитов. Со стороны белой крови у крыс обеих опытных групп наблюдалась лейкопения за счет снижения числа лимфоцитов.

Гематологические показатели, полученные в опытных группах с использованием крыс F, имели однонаправленность изменений показателей, приведенных в табл. 4 для крыс M.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у животных обеих опытных групп явлений гемоконцентрации как следствия диареи и водного «голодания» (табл. 5). Выявленная лимфопения может быть следствием супрессорного влияния компонентов изучаемых препаратов на клетки лимфоцитарного ростка. Необходимо отметить, что выявленные изменения величин показателей периферической крови согласуются с данными литературы [17].

Таблица 5. Изменение гематологических показателей на 3-и сутки обследования от дня введения крысам-самцам DL_{50} препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» (n = 10)

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа	
		«Протуб-4»	«Протуб-4 плюс»
Гемоглобин, г/л	143,33 ± 3,75	161,0 ± 3,85*	170,67 ± 4,25*
Эритроциты, $10^{12}/л$	5,12 ± 0,09	5,85 ± 0,1*	6,02 ± 0,14*
Лейкоциты, $10^9/л$	16,18 ± 1,56	10,68 ± 0,61*	10,08 ± 1,47*
Ретикулоциты, ‰	77,0 ± 2,87	52,67 ± 1,96*#	63,33 ± 0,88*#
Нейтрофилы, $10^9/л$	метамиелоциты	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,02
	палочкоядерные	0,72 ± 0,2	0,39 ± 0,07
	сегментоядерные	2,98 ± 0,66	2,10 ± 0,38
Эозинофилы, $10^9/л$	0,72 ± 0,16	1,16 ± 0,14	1,0 ± 0,28
Базофилы, $10^9/л$	0	0	0
Моноциты, $10^9/л$	0,25 ± 0,06	0,21 ± 0,09	0,24 ± 0,06
Лимфоциты, $10^9/л$	8,44 ± 0,97	5,81 ± 0,56*	5,78 ± 0,97*
Плазмоциты, $10^9/л$	0,03 ± 0,03	0	0
Тромбоциты, $10^9/л$	595,2 ± 3,1	631,1 ± 1,8	622,4 ± 3,0

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$); # – различия статистически достоверны между подопытными группами ($p \leq 0,05$).

Таблица 6. Изменение биохимических показателей сыворотки крови на 3-и сутки обследования от дня введения крысам-самцам DL_{50} препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» (n = 10)

Показатель	Контрольная группа	Подопытные группы	
		«Протуб-4»	«Протуб-4 плюс»
Глюкоза, ммоль/л	5,96 ± 0,21	4,07 ± 0,40*	5,25 ± 0,31
Общий холестерин, ммоль/л	2,47 ± 0,08	2,33 ± 0,05	2,48 ± 0,15
Мочевина, ммоль/л	7,83 ± 0,32	9,22 ± 0,59	8,73 ± 0,36
Общий белок, г/л	76,75 ± 3,18	90,32 ± 3,98*	94,06 ± 1,01*
Альбумины, г/л	36,72 ± 0,73	47,19 ± 2,06*	43,00 ± 0,82*
Глобулины, г/л	40,02 ± 2,62	49,18 ± 2,27*	51,07 ± 1,01*
Аланинаминотрансфераза, ед/л	108,23 ± 6,89	74,15 ± 4,78*	75,37 ± 6,73*
Аспаратаминотрансфераза, ед/л	384,67 ± 26,54	334,22 ± 41,76	326,52 ± 24,58
Общий билирубин, мU/мл	6,54 ± 0,6	14,34 ± 2,79*	16,44 ± 1,99*
Прямой билирубин, мU/мл	4,62 ± 0,61	9,87 ± 3,12*	9,17 ± 2,40*

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

На основании полученных данных можно заключить, что существенных различий в характере действия на гематологические показатели ПТП «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» не выявлено.

В табл. 6 приведены результаты биохимических исследований сыворотки крови крыс на 3-и сутки после введения DL_{50} сравниваемых препаратов. Оценивая выявленные изменения, можно полагать, что увеличение содержания общего белка и его фракций является следствием обезвоживания организма, изменения реологии крови, а не активации синтетических процессов. Снижение активности аланинаминотрансферазы, по-видимому, можно объяснить, способностью компонентов изучаемых препаратов оказывать ингибирующее действие на фермент. В частности, известно, что многие соединения гидразина (к которым относится изониазид) обладают выраженным блокирующим эффектом по отношению к аминотрансферазам [18, 19]. Известно также, что при длительном применении пиразинамида, рифампицина, изониазида возможно нарушение функций печени [17, 20]. Поэтому наблюдаемое увеличение общего билирубина в сыворотке крови животных обеих подопытных групп может быть отражением нарушения пигментной функции печени.

Обращает на себя внимание снижение содержания глюкозы в сыворотке крови крыс, получавших «Протуб-4». Этот эффект наблюдается обычно при воздействии гидразина и ряда его производных, обладающих способностью угнетать глю-

конеогенез. В частности, логично объяснить снижение глюкозы воздействием изониазида [18, 19], так как качественная реакция на изониазид была положительной во всех опытных группах крыс.

Существенно то, что при сравнении величин биохимических показателей сыворотки крови у животных двух опытных групп достоверных различий не выявлено. Оба препарата вызывали изменения одинаковой направленности и выраженности, связанные с обезвоживанием организма (диспепсические явления) и токсическим влиянием на печень. Однонаправленность изменений биохимических показателей в опытных группах была характерна и для крыс F.

Количественное определение наличия экскреции ксантуреновой кислоты в суточной моче крыс на 2-е сутки от введения DL_{50} ПТП «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс», показало диагностическую значимость различий у групп опытных и контрольных животных (табл. 7).

К окончанию срока наблюдения (с 7-х по 14-е сутки обследования) признаков интоксикации у выживших крыс опытных групп при введении DL_{50} исследуемых ПТП визуально не обнаружено: животные свободно перемещались в клетке; цианоз, судороги, патологические выделения из естественных отверстий, пальпаторно определяемые уплотнения отсутствовали; рефлексы – живые, шерсть – блестящая, опрятная; зубы сохранены, молочные железы самок – без особенностей.

Таблица 7. Экскреция в моче крыс ксантуреновой кислоты на 2-е сутки обследования, после введения DL_{50} препаратов «Протуб-4» и «Протуб-4 плюс» ($n = 10$)

Пол	Содержание ксантуреновой кислоты в суточной моче, мкг/мл		
	Контрольная группа	Опытная группа	
		«Протуб-4»	«Протуб-4 плюс»
М	0	11,1 ± 0,4	6,7 ± 0,2
F	0	10,6 ± 0,3	7,2 ± 0,2
Коэффициент достоверности между подопытными группами (t)		$t = 9,8$ (крысы М); $t = 9,4$ (крысы F)	

Выводы

1. Полученные данные свидетельствуют о влиянии пиридоксина гидрохлорида на нейротоксичность, проявляющемся в уменьшении продолжительности эпистатуса, времени нахождения животных в коме, а в целом – на увеличение продолжительности жизни при пероральном введении крысам среднесмертельной дозы комбинированного препарата «Протуб-4

плюс» по сравнению с комбинированным препаратом «Протуб-4», не содержащим пиридоксина гидрохлорид.

2. Введение пиридоксина гидрохлорида в состав единой лекарственной формы препарата «Протуб-4 плюс» оказывало влияние на интегральные показатели состояния организма животных (массу тела, потребление и выделение воды, показатель обмена – ксантуреновую кислоту

как биомаркер измененного обмена триптофана) и не оказало существенного влияния на гематологические и биохимические показатели крови по сравнению с аналогичными показателями при введении препарата «Протуб-4» подопытным животным.

3. Хотя проведенные исследования имеют преимущественно экспериментальное токсикологическое значение, установленные факты могут быть использованы при формировании рациональной программы химиотерапии туберкулеза в сторону выбора препарата, содержащего пиридоксина гидрохлорид.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. М., Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2014. 56 с.
2. Паролина Л.Е., Морозова Т.И., Оттушенникова О.Н. и др. Клиническая эффективность лечения туберкулеза легких при множественной лекарственной устойчивости возбудителя // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 5. С. 138–139.
3. Зоркальцева Е.Ю. Комбинированные противотуберкулезные препараты в практике врача фтизиатра. Иркутск. 2009. 20 с.
4. Иванова Д.А., Заруди Ж.Х., Иванова Т.И. Периферическая полиневропатия на фоне противотуберкулезной химиотерапии // Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2014. № 3. С. 58–64.
5. Гарасько Е.В., Красносельских И.В., Щепочкина Ю.А. Новая лекарственная форма для лечения туберкулеза // Успехи современного естествознания. 2007. № 9. С. 39.
6. Иванова Д.А. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом: общие вопросы // Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2013. № 1. С. 57–65.
7. Фисенко В. Противотуберкулезные средства: принципы действия, побочные эффекты и перспективы создания новых лекарственных препаратов // Врач. 2006. № 12. С. 30–35.
8. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г. и др. Влияние хронобиологических ритмов на токсичность противотуберкулезного препарата «Изониазид» в условиях эксперимента // Токсикологический вестник. 2016. № 2. С. 31–32.
9. РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». М. 1991.
10. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
11. Лойт А.О., Савченков М.Ф. Профилактическая токсикология: руководство для токсикологов-экспериментаторов. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та. 1996. 288 с.
12. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. М.: Медицина. 1978. 176 с.
13. Редкозубова О.М. Особенности развития эпилептического статуса и способов его купирования у крыс разного возраста на литий-пилокарпиновой модели: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. 2007. 200 с.
14. Усов К.И., Юшков Г.Г., Гущина А.А. и др. О нецелесообразности применения собак в качестве экспериментально-биологической модели при доклинических исследованиях комбинированных препаратов, содержащих изониазид // Материалы науч.-практич. конф., посвящ. 25-летию создания службы экспериментального биомедицинского моделирования «Лабораторные животные как основа экспериментальной медицины». Томск: Печатная мануфактура. 2009. С. 104–106.
15. Усов К.И., Юшков Г.Г., Шаура Ю.Ю. и др. Токсикологическая оценка комбинированного противотуберкулезного препарата «Протуб-2®» // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012. № 4-2(86). С. 201–205.
16. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. М.: Практика. 1999. 459 с.
17. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Изд. 16-е, перераб., испр. и доп. М.: Новая Волна. 2012. 1216 с.
18. Колла В.Э., Бердинский И.С. Фармакология и химия производных гидразина. Йошкар-Ола: Мар. кн. изд-во. 1976. 263 с.
19. Портяная Н.И., Соколовский В.В., Осипенко Б.Г. и др. Биохимия гидразинов. Ангарск: Изд-во АГТА. 2005. 92 с.
20. Феценко Ю.И., Черенько С.А., Мальцев В.И. и др. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза // Украинский медицинский часопис. 2008. № 3(65). С. 117–125.

Поступила после доработки 7 октября 2016 г.

THE COMPARATIVE EXPERIMENTAL TOXICOLOGICAL STUDY OF THE COMBINED ANTI-TUBERCULOSIS DRUG CONTAINING AND NOT CONTAINING PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE

© Authors, 2017

K.I. Usov

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Head of Laboratory of Toxicology Tests and Researches Studies, Test Laboratory Center, Research Institute of Biophysics, Angarsk State Technical University; Chair of Pharmacology, Irkutsk State Medical University
E-mail: konstausov@yandex.ru

T.A. Guskova

Dr.Sc. (Med.), Professor, Non-profit Partnership of Assistance to Health Care «Scientific center of quality control» (Moscow)

G.G. Yushkov

Ph.D. (Med.), Research Scientist, Laboratory of Toxicology Tests and Researches Studies, Test Laboratory Center, Research Institute of Biophysics, Angarsk State Technical University

A.V. Mashanov

Ph.D. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Toxicology Tests and Researches Studies, Test Laboratory Center, Research Institute of Biophysics, Angarsk State Technical University

The aim of this work was to evaluate the role of pyridoxine hydrochloride in the reduction of toxicity in acute poisoning modern combined antituberculosis drug containing (drug «Protub-4 plus») and not containing pyridoxine hydrochloride (preparation «Protub-4»).

Materials and methods. As experimental biological models mature white nonlinear rats (males, females) were selected. All animals were kept in a specialized experimental-biological clinics (vivarium). The parameters of acute toxicity of antituberculosis drugs established. The visually assessed behavior of rats was determined at the time of latent period (time before the onset of seizures), symptoms of epistatus and time spent by rats in a coma. The average life expectancy of dead rats, the levels of hematological and biochemical parameters of blood were established.

The results of the study. The obtained data show the effect of the pyridoxine hydrochloride on neurotoxicity, manifested in the reduction of the duration of Epictetus, the time spent animals in a coma, but in General – the increase in lifespan when administered orally to rats, a median lethal dose of a combination drug «Protub-4 plus» compared to a combined preparation «Protub-4», not containing the pyridoxine hydrochloride. The pyridoxine hydrochloride in the drug «Protub-4 plus» had an impact on integral measures of the body condition of animals: body weight, consumption and allocation of water, the rate of exchange – xanturenic acid as a biomarker of altered metabolism of tryptophan and does not have a significant effect on hematological and biochemical blood parameters in comparison with the similar indicators with the introduction of the drug «Protub-4» animals.

Conclusion. The conducted studies are mainly of experimental toxicological importance, but the findings can be used in the formation of rational programs of antituberculosis chemotherapy of tuberculosis in the direction of the preparation containing the pyridoxine hydrochloride.

Key words: acute toxicity, median lethal dose, combined antituberculosis drugs, isoniazid, pyrazinamide, rifampicin, ethambutol, rational chemotherapy, pyridoxine hydrochloride, vitamin B6, experimental studies.

REFERENCES

1. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniju tuberkuleza organov dyhaniya. M., Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada». 2014. 56 s.
2. Parolina L.E., Morozova T.I., Otpushhennikova O.N. i dr. Klinicheskaja jeffektivnost' lechenija tuberkuleza legkih pri mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivo-sti vzbuditelja // Tuberkulez i bolezni legkih. 2015. № 5. S. 138–139.
3. Zorkal'ceva E.Ju. Kombinirovannye protivotuberkuleznye preparaty v praktike vracha ftiziatra. Irkutsk. 2009. 20 s.
4. Ivanova D.A., Zarudi Zh.H., Ivanova T.I. Perifericheskaja polinevropatija na fone protivotuberkuleznoj himioterapii // Tuberkulez i social'no-znachimye zabojevanija. 2014. № 3. S. 58–64.
5. Garas'ko E.V., Krasnosel'skih I.V., Shhepochkina Ju.A. Novaja lekarstvennaja forma dlja lechenija tuberkuleza // Uspehi sovremennogo estestvoznaniya. 2007. № 9. S. 39.
6. Ivanova D.A. Nezhelatel'nye pobochnye reakcii pri lechenii bol'nyh tuberkulezom: obshhie voprosy // Tuberkulez i social'no-znachimye zabojevanija. 2013. № 1. S. 57–65.
7. Fisenko V. Protivotuberkuleznye sredstva: principy dejstvija, pobochnye jeffekty i perspektivy sozdaniya novyh lekarstvennyh preparatov // Vrach. 2006. № 12. S. 30–35.
8. Usov K.I., Gus'kova T.A., Jushkov G.G. i dr. Vlijanie hronobiologicheskikh ritmov na toksichnost' protivotuberkuleznogo preparata «Izoniazid» v uslovijah jeks-perimenta // Toksikologicheskij vestnik. 2016. № 2. S. 31–32.
9. RD 64-126-91 «Pravila doklinicheskoj ocenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv (GLP)». M. 1991.
10. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja. M.: Grif i K. 2012. 944 s.
11. Lojt A.O., Savchenkov M.F. Profilakticheskaja toksikologija: rukovodstvo dlja toksikologov-jeksperimentatorov. Irkutsk: Izd-vo Irkut. un-ta. 1996. 288 s.
12. Trahtenberg I.M., Sova R.E., Sheftel' V.O., Onikienko F.A. Pokazateli normy u laboratornyh zhivotnyh v toksikologicheskom jeksperimente. M.: Medicina. 1978. 176 s.
13. Redkozubova O.M. Osobennosti razvitiya jepilepticheskogo statusa i sposobov ego kupirovanija u krysa raznogo vozrasta na litijpikarpinovoj modeli: Avto-ref. dis. ... kand. biol. nauk. M.: MGU im. M.V. Lomo-nosova. 2007. 200 s.
14. Usov K.I., Jushkov G.G., Gushhina A.A. i dr. O neceleso-obraznosti primenenija sobak v kachestve jeksperimental'no-biologicheskoi modeli pri doklinicheskikh is-sledovanij kombinirovannyh preparatov, sodержashhijh izoniazid // Materialy nauch.-praktich. konf., posvjashh. 25-letiju sozdaniya sluzhby jeksperimental'nogo biomedicinskogo modelirovanija «Laboratornye zhivotnye kak osnova jeksperimental'noj mediciny». Tomsk: Pechatnaja manufaktura. 2009. S. 104–106.
15. Usov K.I., Jushkov G.G., Shaura Ju.Ju. i dr. Toksikologicheskaja ocenka kombinirovannogo protivotuberkuleznogo preparata «Protub-2®» // Bjulleten' VSNC SO RAMN. 2012. № 4-2(86). S. 201–205.
16. Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika / Per. s angl. M.: Praktika. 1999. 459 s.
17. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva. Izd.16-e, pererab., ispr. i dop. M.: Novaja Volna. 2012. 1216 s.
18. Kolla V.Je., Berdinskij I.S. Farmakologija i himija proizvodnyh gidrazina. Joshkar-Ola: Mar. kn. izd-vo. 1976. 263 s.
19. Portjanaja N.I., Sokolovskij V.V., Osipenko B.G. i dr. Biohimija gidrazinov. Angarsk: Izd-vo AGTA. 2005. 92 s.
20. Feshhenko Ju.I., Cheren'ko S.A., Mal'cev V.I. i dr. Ocenka znachimosti pobochnykh reakcij protivotuberkuleznyh preparatov pri lechenii tuberkuleza // Ukraïns'kij medicinij chasopis. 2008. № 3(65). S. 117–125.