

УДК 615.09 : 615.33

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕРАПИИ СОПРОВОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ АДЕМЕТИОНИНА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

К.И. Усов¹, Т.А. Гуськова², Г.Г. Юшков¹,
Л.П. Гришина³, А.С. Гуцин⁴

¹НИИ Биофизики, лаборатория токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, Российская Федерация

²Центр трансфера фармацевтических технологий им. М.В.Дорогова Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д.Ушинского, 150010. г. Ярославль, Российская Федерация

³ГБУЗ «Иркутское областное патологоанатомическое бюро», 664079, г. Иркутск, Российская Федерация

⁴АО «Фармасинтез» Иркутск, 664007, г. Иркутск, Российская Федерация

Статья содержит результаты экспериментальных токсикологических исследований к обоснованию применения адеметионина в терапии сопровождения, с целью предупреждения токсических поражений печени при применении противотуберкулезных препаратов.

Ключевые слова: гепатотоксичность, побочные реакции, гепатопротектор, адеметионин, противотуберкулезные препараты, изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол, химиотерапия, терапия сопровождения.

Введение. Одним из нежелательных эффектов в ряду осложнений при химиотерапии туберкулеза легких являются побочные реакции, обусловленные гепатотоксичностью многих противотуберкулезных препаратов (ПТП), частота проявления которой варьирует от 6 до 86 % [1-5, 8-9]. Среди причин относительно нечастых летальных исходов, обусловленных применением ПТП, преобладают лекарственные поражения печени [1]. Это связано с тем, что в печени осуществляется метаболическая трансформация большинства ПТП, в частности, гепатотоксичностью обладают рифампицин, изониазид, пиразинамид, этионамид – препараты I ряда, протионамид, аминосалициловая кислота, применяемая в РФ под названием ПАСК [4, 6-7].

Проявление гепатотоксичности при поликомпонентной химиотерапии ПТП является одной из главных причин низкой эффективности и плохой переносимости лечения, наряду с нарастаю-

щей устойчивостью возбудителя к ПТП и низкой комплаентностью больных. Отмена ПТП в связи с проявлением нежелательных побочных реакций производится у 20-91 % больных туберкулезом, в результате чего возрастает риск сохранения активной популяции возбудителя, быстрее формируется его устойчивость к проводимой терапии [8-10].

Таким образом, лекарственное поражение печени, вызванное применением ПТП, при поликомпонентной химиотерапии туберкулеза, представляет собой весьма значительную и актуальную проблему для лекарственной токсикологии, рациональной фармакотерапии, фтизиатрии, которая требует консолидации в направлении поиска и разработки новых подходов к обоснованию терапии сопровождения с применением оптимальных гепатопротекторов, основной целью которой является предупреждение подобного рода осложнений на фоне химиотерапии туберкулеза.

Усов Константин Ильич (Usov Konstantin Ilich), кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», konstausov@yandex.ru
Гуськова Татьяна Анатольевна (Guskova Tatyana Anatolevna), заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заместитель Председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, ведущий научный сотрудник отдела доклинических исследований Центра трансфера фармацевтических технологий имени М. В. Дорогова, Ярославский государственный педагогический университет имени К. Д. Ушинского, tagus@rambler.ru

Юшков Геннадий Георгиевич (Jushkov Gennadij Georgievich), кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», prof_ushkov@mail.ru
Гришина Людмила Петровна (Lyudmila Petrovna Grichina), кандидат медицинских наук, доцент, врач-патологоанатом высшей категории, начальник ГБУЗ «Иркутское областное патологоанатомическое бюро», grishina12@yandex.ru

Гуцин Александр Сергеевич (Guschin Aleksandr Sergeevich), кандидат медицинских наук, доцент, советник отдела науки АО «Фармасинтез», guschin@pharmasyntez.com

Сегодня одним из наиболее эффективных и безопасных по клиническим данным гепатопротекторов является – адеметионин (АМ), представленный в России под торговыми наименованиями: «Гептрал®» или «Гептор®». По химической природе АМ относится к аминокислотам и их производным, АМ выполняет важнейшую роль в реакциях трансметилирования, транссульфирования и аминопропилирования, участвует в метаболизме ряда ксенобиотиков, в биосинтезе фосфолипидов, глутатиона, таурина и других биологически активных соединений [11-12, 17-19].

Цель исследования. Экспериментально обосновать использование АМ в терапии сопровождаемая для предупреждения развития гепатотоксических реакций при введении лабораторным животным противотуберкулезных препаратов, обладающих гепатотоксичностью [4, 6-7].

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на белых нелинейных крысах-самцах 4 месячного возраста, массой 180-200 г. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (вивария), ветеринарное удостоверение 238 № 0019817. Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями [15, 16] по работе с экспериментальными животными и разрешены локальным этическим комитетом.

В экспериментах использовали ПТП: изониазид®, рифампицин®, пиразинамид® и АМ – гепатопротектор Гептор® (МНН – адеметионин). Препараты вводили в желудок с помощью металлического атравматичного зонда. Содержимое капсул и таблетки растирали в ступке и вводили в виде суспензии в дистиллированной воде. Однократный объем вводимой суспензии для крыс не превышал 5 мл, максимальная продолжительность ежедневного введения не более 60 суток, в зависимости от схемы введения.

Дозу вводимого препарата определяли для каждого животного в мг/кг массы тела по действующему веществу. Все животные были разделены на 4 группы. Первой группе животных ПТП вводили до появления признаков гепатотоксичности, после чего ПТП отменяли и на следующие сутки вводили гепатопротектор. Второй группе гепатопротектор вводили вместе с ПТП с начала эксперимента. Третья группа крыс получала только АМ. Четвертой группе крыс ежедневно вводили только питьевую воду, предварительно прокипяченную и охлажденную в течение 30 минут.

ПТП вводили животным ежедневно в утренние часы в дозах, значительно превышающих максимальные суточные дозы (МСД) для человека. Изониазид вводили в дозе 120 мг/кг (1/10 от DL_{50}), что в 21 раз превышает МСД, пиразинамид – в дозе 190 мг/кг (1/20 от DL_{50}), что в 7 раз превышает

МСД, рифампицин – в дозе 634 мг/кг (1/30 от DL_{50}), что в 60 раз превышает МСД. Токсические дозы ПТП использованы с целью моделирования процесса развития гепатотоксических реакций (лекарственного осложнения) у подопытных крыс. Токсические дозы ПТП использованы с целью моделирования гепатотоксических реакций (лекарственного осложнения) у подопытных крыс.

Гепатопротекторное средство – АМ во всех подопытных группах применяли в дозе 120 мг/кг. Выбор дозы АМ 120 мг/кг был обоснован раннее проведенным исследованием эффективности АМ [18], в дозах 105 мг/кг и 161 мг/кг при поражении печени крыс ПТП. Введение АМ осуществляли за 2 часа до введения ПТП. В контрольной группе животные ежедневно получали только дистиллированную воду в объеме 12,5 мл/кг.

Диагностика гепатотоксических реакций, после введения ПТП, включала следующие приёмы – ежедневный учёт общего состояния животного: внешний вид, особенности поведения, мониторинг группового потребления корма и потребления воды (в % по отношению к группе динамического контроля), консистенции каловых масс и их цвет, цвет и прозрачность мочи [4]. Определяли температуру тела животного, с использованием инфракрасного, бесконтактного, цифрового ветеринарного термометра «Termoscan» (Китай), путем наведения сканирующего лазерного луча на анальное отверстие крыс, на расстоянии 5 см от него, каждое измерение повторяли 3 раза с временным интервалом между измерениями 1 минута. В сыворотке крови, полученной при декапитации подопытного животного, определяли содержание ферментов: аланинаминотрансферазу (АЛТ), аспаратаминотрансферазу (АСТ), гаммаглутамилтранспептидазу, урканиназу, щелочную фосфатазу, фосфолипазу А [20]; из клинически значимых биохимических показателей определяли: общий белок, общий холестерин, общий и прямой билирубин, глюкозу; 3) активность АЛТ и АСТ [22], содержание гликогена определяли микрометодом [23] в гомогенизированной ткани печени с последующим определением оптической плотности на спектрофотометре СФ-26 (Россия) и расчетом концентрации в мкмоль/л. Величины биохимических показателей определяли с использованием биохимического анализатора FP-901M (Labsystems, Финляндия) и стандартных наборов реактивов, согласно приложенным к ним инструкциям.

В параллельных группах животных – опыта и динамического контроля, осуществляли нагрузочные диагностические пробы – гексобарбиталовую, путем внутривенного введения 2 % раствора гексенала в дозе 60 мг/кг и бромсульфалеиновую, путем внутривенного введения 5 %

раствора бромсульфалеина в дозе 20 мг/кг в боковую хвостовую вену крыс. Эти группы были созданы для исключения влияния вводимого, с диагностической целью, бромсульфалеина и гексенала на оцениваемые лабораторные, биохимические и морфологические показатели.

Проводили аутопсию с макроскопической оценкой печени: внешний вид, цвет, консистенция (плотность), состояние переднего края. Одновременно определяли относительную массу печени в виде коэффициента (отношение массы печени в мг к массе тела в г). Гистологическое исследование образцов печени включало морфометрию. Состояние печени оценивали по объемной доле гепатоцитов в поле зрения, а степень дистрофических изменений в них – в баллах: 4 балла более 70 % пространства заполнено вакуолями, 3 балла от 70 до 50 %, 2 балла от 50 до 25 % и 1 балл от 25 % и менее [5].

Для обработки полученных результатов применялись 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 (M), стандартную ошибку среднего арифметического значения (m), производили оценку значимости различий средних величин по t-критерию. Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$. Методики расчета величин соответствуют требованиям, изложенным в руководстве по математической статистике для медико-биологических исследований [23].

Результаты и обсуждение. К концу 1 суток после первого введения ПТП у подопытных крыс наблюдались признаки развития диареи: консистенция кала была мягкая и влажная, размер фекалий уменьшен в 2 раза, при этом форма кала была сформирована, плавучесть отсутствовала, У животных фекалии и моча были окрашены в краснокирпичный цвет (цвет обусловлен введением рифампицина). Через 3-4 дня от начала введения препаратов окрашивались и выступающие части тела животных: ушные раковины, лапки, хвост, что свидетельствовало о признаках развития материальной кумуляции [24], это подтверждалось и окраской внутренних органов при аутопсии подопытных крыс на 30 и 60 сутки эксперимента. У 20 % крыс, получавших ПТП с АМ,

Таблица 1

Содержание гликогена в гомогенизированных тканях печени и уровень глюкозы в сыворотке крови крыс получавших ПТП с АМ и без него (n = 120)

Препараты и продолжительность их ежедневного введения	Сроки регистрации показателя	Глюкоза в сыворотке крови, ммоль/л	Гликоген в гомогенизированных тканях печени мкмоль/г
ПТП без АМ (1-30 сутки) АМ после отмены ПТП (31-60 сутки)	3 сутки	9,2 ± 2,1*	93,1 ± 1,9*
	30 сутки	2,1 ± 0,7*	40,4 ± 2,6***
	60 сутки	3,9 ± 2,2	89,2 ± 2,8**
ПТП с АМ (1-60 сутки)	3 сутки	6,6 ± 1,2	98,6 ± 2,8
	30 сутки	3,7 ± 0,5	79,7 ± 3,1***
	60 сутки	2,6 ± 0,5	72,8 ± 3,8***
АМ (1-60 сутки)	3 сутки	4,2 ± 0,8	104,2 ± 3,4
	30 сутки	4,5 ± 1,1	110,8 ± 4,2
	60 сутки	4,8 ± 1,1	131,1 ± 6,0**
Динамический контроль	3 сутки	3,8 ± 1,1	102,1 ± 2,9
	30 сутки	4,6 ± 1,0	105,5 ± 1,8
	60 сутки	4,4 ± 1,3	108,9 ± 3,6

Примечание: уровень значимости различий по отношению к величинам динамического контроля, при *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

признаки диареи проявлялись на 2-4 сутки введения препаратов, а у 35% животных в группе – на 53-60 сутки. Только для крыс, получавших ПТП без АМ, начиная с 11 суток эксперимента, наблюдался альтернанс фрагментарного проявления признаков диареи и обстипации, характеризующийся сменой признаков проявления каждые 2-4 дня. На 22 сутки применения препаратов групповое суточное потребление корма снижалось на 74% по сравнению с группой динамического контроля и на 52% по сравнению с подопытной группой крыс, получавшей ПТП с АМ. Отмечено снижение группового потребления питьевой воды, к 30 суткам оно составило 81% (только ПТП) и на 12% (ПТП + АМ). К 30 суткам на фоне снижения потребления воды и корма наблюдалось достоверное снижение массы тела на 47% у крыс, получавших ПТП и 21% у крыс, получавших ПТП с АМ. На фоне вышеперечисленных реакций на вводимые ПТП наблюдалось повышение уровня глюкозы в крови на 3 сутки эксперимента и понижение содержания гликогена в печени крыс на 30 и 60 сутки эксперимента (табл. 1). На фоне снижения гликогена в печени при оценке неврологического статуса у крыс из первой и второй подопытной групп визуально, при пальпаторном обследовании, установлена мышечная гипотония, животные были вялые, малоподвижные, но при этом синкинезии и защитные рефлексы у крыс соответствовали норме.

Проявление диспепсической медикаментозной диареи у 70 % подопытных крыс, получавших

только ПТП, без АМ, по времени проявления совпадало с эпизодическим проявлением субфебрилитета. В период с 28-33 сутки введения препаратов у 40% крыс было выявлено развитие гипертермии ($38,8 \pm 0,2$ – опыт; $36,3 \pm 0,1$ – динамический контроль, 30 сутки эксперимента, при $p < 0,001$). Для крыс получавших ПТП и последовательно АМ, субфебрилитет наблюдался только у 20% подопытных животных на 54-60 сутки.

Наряду с гипертермией у подопытных крыс, регистрировали повышение степени ретенции бромсульфалеина и увеличение продолжительности гексеналового сна на 30 и 60 сутки эксперимента, что свидетельствовало о нарушении детоксицирующей функции печени (табл. 2).

Определение содержания АЛТ, АСТ в сыворотке крови показало, что к 30 суткам у подопытных крыс, получавших ПТП без гепатопротектора, содержание этих ферментов повышалась в 3 раза, при этом их активность в гомогенатах печени была снижена на 85% и 63%, соответственно, по сравнению с контрольной группой (табл. 3). В соответствии с Национальными клиническими рекомендациями для лечения туберкулеза в России [21] определяемое повышение содержания трансфераз крови (АЛТ, АСТ) в три и более раз по результатам клинического биохимического анализа крови больного является основанием для отмены гепатотоксичных ПТП, или полного прекращения химиотерапии туберкулеза с отменой всех применяемых ПТП. У крыс, получавших гепатопротектор вместе с ПТП в течение

Таблица 2

Бромсульфалеиновая и гексобарбиталовая проба при лекарственном поражении печени крыс ПТП с АМ и без него (n = 160)

Препараты и продолжительность их ежедневного введения	Сроки регистрации показателей	Бромсульфалеиновая проба, мкг/мл ($M \pm m$)	Продолжительность гексеналового сна, минуты ($M \pm m$)
ПТП без АМ (1-30 сутки) АМ после отмены ПТП (31-60 сутки)	30 сутки	$22,5 \pm 0,92^{***}$	$69,2 \pm 0,9^{***}$
	60 сутки	$19,5 \pm 0,84^{**}$	$54,2 \pm 0,8^{***}$
ПТП с АМ (1-60 сутки)	30 сутки	$16,2 \pm 0,61$	$42,8 \pm 1,9^*$
	60 сутки	$17,8 \pm 0,57$	$43,0 \pm 0,7^{**}$
АМ (1-60 сутки)	30 сутки	$14,5 \pm 0,83$	$37,9 \pm 0,7$
	60 сутки	$15,0 \pm 0,76$	$38,2 \pm 0,6$
Динамический контроль	30 сутки	$14,8 \pm 0,84$	$38,0 \pm 0,5$
	60 сутки	$14,2 \pm 0,72$	$38,4 \pm 0,8$

Примечание: уровень значимости различий по отношению к величинам динамического контроля, при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 3

Динамика АЛТ и АСТ у крыс при лекарственном поражении печени крыс ПТП с АМ и без него (n = 120)

Определяемые показатели	Препараты и продолжительность их приема	Сроки регистрации показателей		
		3 сутки	30 сутки	60 сутки
АЛТ, содержание в сыворотке крови, Ед/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	87,6 ± 0,5***	191,2 ± 6,6***	136,0 ± 5,2***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	67,2 ± 2,1*	71,2 ± 4,1*	79,6 ± 3,9**
	АМ, с 1-60 сутки	60,9 ± 0,7	59,2 ± 1,8	62,2 ± 3,4
	Динамический контроль	61,2 ± 1,5	61,8 ± 2,0	66,2 ± 1,9
АЛТ, активность в печени, мкмоль/мл на 1 мг белка в час	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	7,2 ± 1,3	5,3 ± 0,4***	6,2 ± 0,8**
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	9,0 ± 0,4	8,4 ± 0,5	7,1 ± 0,7*
	АМ, с 1-60 сутки	9,7 ± 0,7	9,6 ± 0,9	10,1 ± 1,2
	Динамический контроль	9,5 ± 1,1	9,8 ± 0,7	9,1 ± 0,5
АСТ, содержание в сыворотке крови, Ед/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	68,2 ± 2,2*	172,4 ± 13,2***	129,2 ± 7,3***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	56,7 ± 6,0	64,9 ± 4,1	71,2 ± 3,7*
	АМ, с 1-60 сутки	55,2 ± 2,9	52,8 ± 2,7	57,1 ± 5,1
	Динамический контроль	57,2 ± 4,2	55,0 ± 3,3	58,4 ± 3,2
АСТ, активность в печени мкмоль/мл на 1 мг белка в час	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	4,7 ± 0,3	3,8 ± 0,2***	1,7 ± 0,2***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	4,9 ± 0,4	5,1 ± 0,3*	3,8 ± 0,4*
	АМ, с 1-60 сутки	5,9 ± 0,3	5,4 ± 0,4	6,6 ± 0,2
	Динамический контроль	5,2 ± 0,2	6,2 ± 0,3	5,9 ± 0,6

Примечание: уровень значимости различий по отношению к величинам динамического контроля, при *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

всего эксперимента, содержание АЛТ, АСТ в сыворотке крови повышалось лишь на 15 % и 18 % соответственно, по сравнению с группой динамического контроля, что позволило продолжить введение ПТП с применением АМ, до 60 суток. Для подопытных крыс, получавших только ПТП с 1-30 сутки, было принято решение с 31 суток эксперимента отменить введение ПТП из-за высокой вероятности наступления биологической смерти подопытных крыс, как следствия развития тяжелого и необратимого лекарственного осложнения.

Изучение динамики других определяемых биохимических показателей в сыворотке крови (табл. 4), свидетельствовало, что совместное применение ПТП с АМ снижает гепатотоксичность ПТП. Так как к 30 суткам эксперимента из определяемых показателей достоверные отличия по отношению к группе динамического контроля были получены только по показателю: уроганиназа, общий и прямой билирубин, общий белок. При этом процент понижения показателей по отношению к данным полученным у подопытной группы получавшей только

Таблица 4

Биохимические показатели при лекарственном поражении печени крыс ПТП с АМ и без него, в сыворотке крови (n = 120)

Определяемые показатели	Препараты и продолжительность их приема	Сроки регистрации показателей		
		3 сутки	30 сутки	60 сутки
Гамма-глутамил-транспептидаза, Ед/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	143,2 ± 21,8*	42,2 ± 9,8*	48,3 ± 6,2*
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	92,2 ± 9,2	65,2 ± 8,6	56,9 ± 4,8*
	АМ, с 1-60 сутки	77,1 ± 12,6	78,5 ± 8,2	80,1 ± 12,0
	Динамический контроль	80,8 ± 14,2	82,8 ± 13,9	79,7 ± 10,3
Уроканиназа, мкмоль/мл на 100 мл	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	3,2 ± 0,64***	8,7 ± 1,33***	4,2 ± 0,71***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	1,8 ± 0,24*	2,8 ± 0,34***	3,2 ± 0,77*
	АМ, с 1-60 сутки	1,1 ± 0,08	1,1 ± 0,18	1,3 ± 0,12
	Динамический контроль	1,0 ± 0,16	0,9 ± 0,14	1,2 ± 0,21
Фосфолипаза А, мкг/мл	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	0,83 ± 0,25	3,10 ± 0,17***	2,04 ± 0,14**
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	0,88 ± 0,11	1,26 ± 0,21	1,71 ± 0,18*
	АМ, с 1-60 сутки	0,74 ± 0,16	0,79 ± 0,23	0,80 ± 0,15
	Динамический контроль	0,91 ± 0,19	0,86 ± 0,17	0,83 ± 0,31
Щелочная фосфатаза, Ед/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	346 ± 13,1	424 ± 16,2***	391 ± 7,2***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	333 ± 10,2	348 ± 9,4	377 ± 11,1**
	АМ, с 1-60 сутки	311 ± 12,7	305 ± 10,0	314 ± 11,9
	Динамический контроль	322 ± 12,2	330 ± 14,5	326 ± 9,1
Билирубин общий, ммоль/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	8,7 ± 0,06***	11,1 ± 0,09***	9,1 ± 0,11***
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	8,3 ± 0,08*	8,8 ± 0,07***	9,3 ± 0,03***
	АМ, с 1-60 сутки	8,0 ± 0,04	8,2 ± 0,03*	8,2 ± 0,09
	Динамический контроль	8,1 ± 0,04	8,1 ± 0,03	8,2 ± 0,05

Билирубин прямой, ммоль/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	2,90 ± 0,07	4,21 ± 0,12***	3,21 ± 0,07*
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	2,74 ± 0,11	3,06 ± 0,08*	3,40 ± 0,09**
	АМ, с 1-60 сутки	2,64 ± 0,05	2,74 ± 0,14	2,76 ± 0,03
	Динамический контроль	2,71 ± 0,12	2,78 ± 0,09	2,80 ± 0,15
Холестерин общий, ммоль/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	2,07 ± 0,15	4,31 ± 0,31***	2,82 ± 0,38*
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	2,09 ± 0,28	2,12 ± 0,16	2,41 ± 0,22
	АМ, с 1-60 сутки	1,72 ± 0,19	1,81 ± 0,23	1,76 ± 0,18
	Динамический контроль	1,68 ± 0,21	1,72 ± 0,16	1,94 ± 0,19
Общий белок, г/л	ПТП с 1-30 сутки, АМ с 31-60 сутки после прекращения приема ПТП	74,2 ± 0,6*	95,2 ± 0,5***	88,2 ± 0,5**
	ПТП с АМ, с 1-60 сутки	75,8 ± 1,1	82,2 ± 0,6*	83,0 ± 0,8
	АМ, с 1-60 сутки	78,2 ± 0,8	77,0 ± 1,0	79,2 ± 0,4
	Динамический контроль	77,8 ± 0,9	79,1 ± 0,5	81,2 ± 1,0

Примечание: уровень значимости различий по отношению к величинам динамического контроля, при *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Таблица 5

Массовый коэффициент печени крыс и показатели морфометрии лекарственного поражения печени ПТП с АМ и без него (n = 80)

Препараты и продолжительность их ежедневного введения	Сроки регистрации показателей	Массовый коэффициент печени, г / 1 кг веса тела	Объемная доля дистрофических изменений гепатоцитов, %	Выраженность дистрофических изменений гепатоцитов, балл
ПТП без АМ (1-30 сутки) АМ после отмены ПТП (31-60 сутки)	30 сутки	61,3 ± 0,2***	74,6 ± 3,1***	3,82 ± 0,13***
	60 сутки	54,4 ± 0,2***	69,3 ± 2,8***	3,29 ± 0,19***
ПТП с АМ (1-60 сутки)	30 сутки	40,2 ± 0,6*	48,2 ± 4,1	2,1 ± 0,25*
	60 сутки	42,0 ± 0,8*	51,6 ± 3,4*	2,5 ± 0,37*
АМ (1-60 сутки)	30 сутки	38,8 ± 0,4	38,5 ± 2,5	1,4 ± 0,16
	60 сутки	40,1 ± 0,2	39,8 ± 2,8	1,7 ± 0,11
Динамический контроль	30 сутки	38,2 ± 0,1	39,6 ± 2,7	1,50 ± 0,12
	60 сутки	39,4 ± 0,3	40,3 ± 3,3	1,54 ± 0,23

Примечание: уровень значимости различий по отношению к величинам динамического контроля, при *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

ПТП с 1-30 сутки составил: 68% по показателю уробилиногена, 21% – общий билирубин, 27% – прямой билирубин, 14% – общий белок по сравнению.

Применение АМ с 31-60 сутки эксперимента уже на фоне яркого проявления гепатотоксического осложнения, развившегося на 30 сутки введения ПТП, не приводило к полному восстановлению оцениваемых биохимических показателей на 60 сутки эксперимента. В частности, процент снижения показателей - содержание АЛТ, АСТ в сыворотке крови на 60 сутки по сравнению с полученными данными на 30 сутки эксперимента составил лишь 41 % и 33 %, соответственно (табл. 3).

При аутопсии подопытных крыс, получавших ПТП, макроскопически у всех крыс регистрировали окрашивание внутренних органов и тканей в цвет вводимого рифампицина. Показатели состояния печени представлены в таблице 5.

У контрольной группы животных отмечено умеренное полнокровие сосудов печени при сохранности балочной структуры долек. Набухание гепатоцитов, в портальных трактах, а также скудное количество лимфоцитов соответствовало норме (рис. 1).

Морфоструктурные изменения, отмеченные у крыс, получавших только ПТП ежедневно в течение 30 суток, представлены на рисунке 2. У этих животных наблюдалась очаговая дискомплексация печеночных балок. Инфильтрация портальных трактов с наличием в синусоидах микрофиламентов, лимфоцитов, лейкоцитов. Незначительно выраженный перипортальный склероз. Гидропическая дистрофия гепатоцитов, кариорексис, умеренное полнокровие.

Для группы крыс, получавших ПТП с АМ с первого дня эксперимента, на 30 сутки балочная структура долек была сохранена, отмечался отек пространств Диссе, мутное набухание цитоплазмы гепатоцитов, кариорексис. В портальных трактах периваскулярная мелкоочаговая инфильтрация макрофагами, лимфоцитами, единичными эозинофилами, слабо выраженный очаговый перипортальный склероз (рис. 3).

При назначении гепатопротектора после 30-дневного введения ПТП полного восстановления структуры печени к концу 60 суток не происходило (рис. 4).

Отмечено фрагментарное восстановление балочного строения долек гепатоцитов в менее пораженных участках ткани печени и умеренное полнокровие, но при этом наблюдалась гидропическая дистрофия гепатоцитов с набуханием их ядер.

Структура печени крыс, получавших гепатопротектор вместе с ПТП с начала эксперимента в течение 60 дней, представлена на рисунке 5.

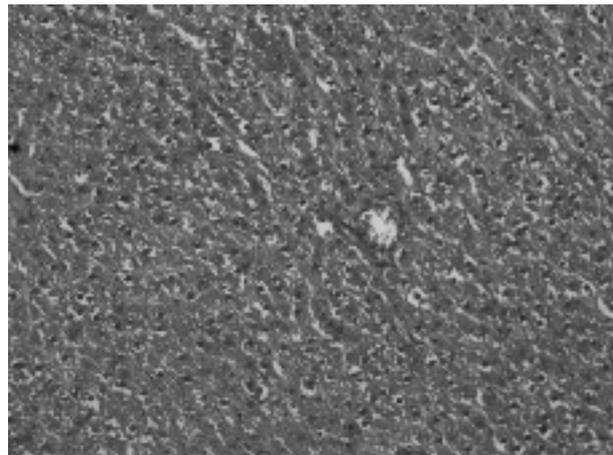


Рис. 1. Печень крыс из контрольной группы. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

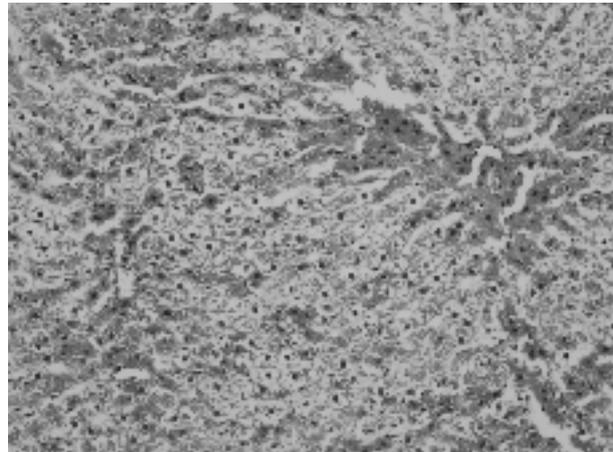


Рис. 2. Печень крыс получавших ПТП, 30 сутки. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

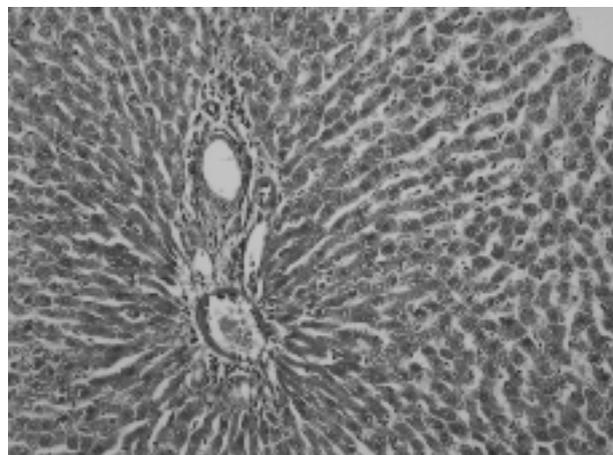


Рис. 3. Печень крыс получавших ПТП + АМ, 30 сутки. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

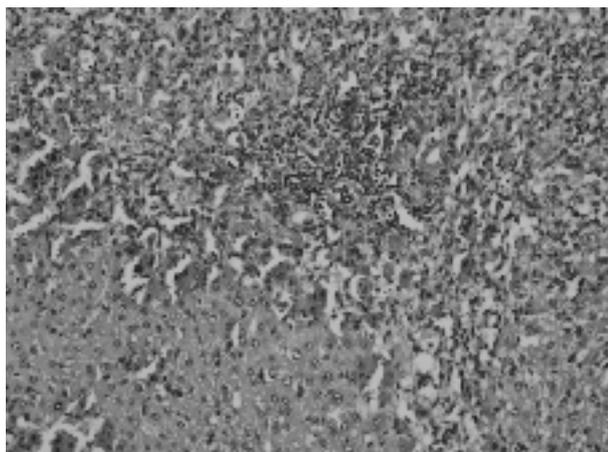


Рис. 4. Печень крыс, получавших АМ после 30-дневного введения ПТП, и подвергшихся эвтаназии на 60 сутки эксперимента. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

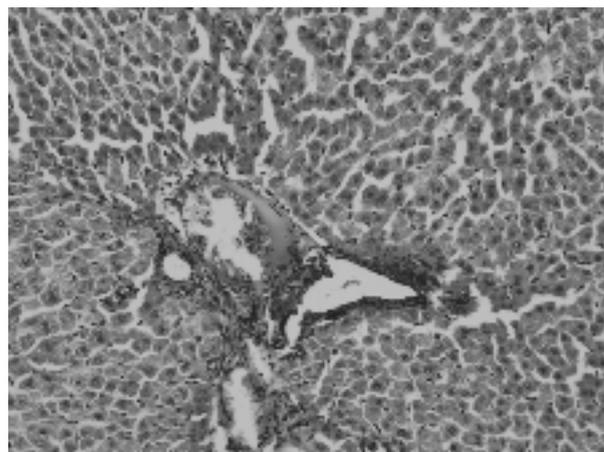


Рис. 7. Печень крыс на 60 сутки эксперимента получавших АМ 1-60 сутки. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

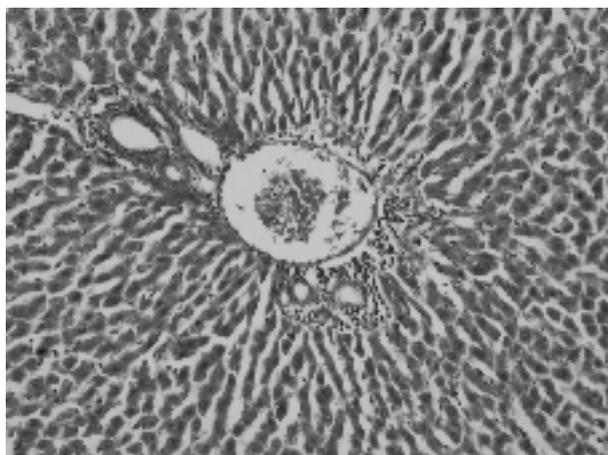


Рис. 5. Печень крыс на 60 сутки эксперимента получавших ПТП + АМ 1-60 сутки. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

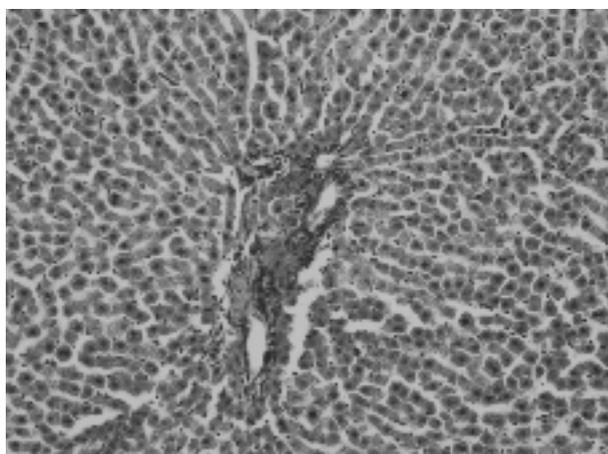


Рис. 6. Печень крыс на 30 сутки эксперимента получавших АМ 1-30 сутки. Окраска Гематоксилином и эозином. Увеличение x 400

Балочная структура сохранена. В отдельных портальных трактах умеренно выраженный склероз, очаговая периваскулярная и перидуктальная инфильтрация макрофагами, лимфоцитами, лейкоцитами. В синусоидах имеются немногочисленные фокусы подобной клеточной инфильтрации.

На рисунках 6 (исследование на 30 день введения) и 7 (исследование на 60 день) представлена структура ткани печени крыс, получавших один гепатопротектор в течение 60 дней. Отмечено умеренное полнокровие, балочная структура долек сохранена, набухание гепатоцитов, наличие двуядерных гепатоцитов. В портальных трактах наблюдается периваскулярная очаговая лимфоцитарная инфильтрация. В синусоидах немногочисленные лимфоциты.

Таким образом, гистологические исследования ткани печени показали, что совместное применение ПТП с гепатопротектором (АМ) значительно снижает гепатотоксичность ПТП.

Выводы:

1. Применение гепатопротектора (АМ), начиная с первого дня введения противотуберкулезных препаратов (ПТП) приводит к снижению гепатотоксичности последних, что было подтверждено биохимическими и гистологическими методами исследования.

2. Применение АМ, в качестве гепатопротектора позволило в 2 раза увеличить продолжительность применения ПТП животным без развития тяжелого медикаментозного осложнения.

3. Полученные результаты дают основание рекомендовать включение гепатопротекторов в стандартную схему химиотерапии туберкулеза для улучшения переносимости ПТП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова Д.А. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. 2011; 6: 60-9.
2. Фещенко Ю.И., Черенко С.А., Мальцев В.И. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза. Укр. мед. часопис. 2008; 5: 117-25.
3. Hartleb M, Biernat, Kochel A. Drug-induced liver damage – a three year study of patients from one of gastroenterological department. Med Sci Monit. 2002; 8: 292-96.
4. Усов К. И. Изучение побочных реакций препаратов изониазида и возможность их коррекции с помощью пиридоксина гидрохлорида: Дисс. ... канд. биол. наук: 14.03.06 Усов Константин Ильич; Белгородский государственный национальный исследовательский университет. Белгород; 20
5. Можожина Г.Н., Елистратова Н.А., Михайлова Л.П., Макарова О.В., Султанов В.С., Трусов В.Б. Экспериментальное обоснование применения ропрена для профилактики поражений печени, вызванных изониазидом. Туберкулез и болезни легких. 2014; (7): 47-53.
6. Ерохин В.В., Панасек И.А., Адамович Н.В. Клинико-морфологические критерии лекарственного гепатита у больных туберкулезом легких. Проблемы туберкулеза. 1991; 1: 35-9.
7. Казаков К.С., Каланходжаев А.А., Козарез М.И. Частота и характер побочных действия противотуберкулезных химиопрепаратов. Проблемы туберкулеза. 1991; 12: 28-31.
8. Иванова Д.А., Борисов С.Е. Оценка риска и мониторинг гепатотоксических реакций у больных туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. 2017; 95 (9): 40-8.
9. Иванова Д. А., Борисов С. Е. Отменить или подождать?: показания к отмене противотуберкулезных препаратов при нежелательных реакциях. Туберкулез и болезни лёгких. 2018; 96 (2): 47-54.
10. Мишин В.Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулеза легких. М.: Медицинское информационное агентство; 20
11. Подымова С.Д. Адemetionin: фармакологические эффекты и клиническое применение препарата. РМЖ. 2010; 18 (13): 800-5.
12. Бирон Э.В., Калинина М.В. Лекарственные поражения печени у больных туберкулезом и возможности их коррекции. Фарматека. 2013; 4: 84-92.
13. РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Москва; 1991.
14. Гуськова Т.А. Особенности доклинического токсикологического изучения антибактериальных средств. Фармакология и токсикология. 1985; XLVIII (3): 119-122
15. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: приказ МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 7 Available at: <http://www.vita.org.ru/exper/order-peotrovsky.htm>.
16. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики: приказ министерства здравоохранения и социального развития РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н. Available at: <http://www.docscntd.ru/document/420350679>.
17. Суханов Д.С. Антиоксидантные свойства ремаксола, реамберина и адemetionina при лекарственных поражениях печени у больных на фоне противотуберкулезной терапии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013; 76 (4): 45-8.
18. Суханов Д.С., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Витовская М.Л., Коваленко А.Л. Гепатотропное действие рунихола и адemetionina при повреждении печени противотуберкулезными препаратами основного ряда в эксперименте. Архив патологии. 2014; 76 (2): 26-31.
19. Суханов Д.С., Артюшкова Е.Б., Дудка В.Т., Оквитий С.В. Эффективность ремаксола и адemetionina при сочетанном экспериментальном поражении печени противотуберкулезными препаратами резервного ряда и алкоголем. Туберкулез и болезни легких. 2014; 91. № (4): 59-63.
20. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник. М.: Колос; 2004
21. Яблонский П. К., ред Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
22. Портяная Н.И., Соколовский В.В., Осипенко Б.Г. Биохимические исследования в токсикологическом эксперименте. Иркутск: ИГУ; 1990;
23. Акимов П. А., Орбиданс А. Г., Терехин Г. А., Терехина Н. А. Влияние острой алкогольной интоксикации на содержание гликогена в печени и скелетных мышцах. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2010; 2: 15-7.
24. Ланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999.
25. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г., Машанов А.В. Гушина А.А. Влияние хронобиологических ритмов на токсичность изониазида и рифампицина при комбинированном применении в условиях эксперимента на крысах. Токсикологический вестник. 2017; 4: 24-33.
1. D.A. Ivanova. Adverse reactions in the treatment of patients with tuberculosis. Tuberculosis and lung disease. 2011; 6: 60-9. (in Russian)
2. Yu.I. Feshchenko, S.A. Cherenko, V.I. Maltsev. Evaluation of the significance of adverse reactions of antituberculosis drugs in the treatment of tuberculosis. Ukr. med. chronicle. 2008; 5: 117-25. (in Russian)
3. M. Hartleb, L. Biernat, A. Kochel. Drug-induced liver damage – a three year study of patients from one of gastroenterological department. Med Sci Monit. 2002; 8: 292-96.
4. K.I. Usov. Study of adverse reactions of the drugs isoniazid and possibility of their correction with the help of pyridoxine hydrochloride. The PhD thesis's of K.I. Usov; Belgorod State National Research University. Belgorod; 20 (in Russian)
5. G.N. Mozhokina, N.A. Elistratova, L.P. Mikhailova, O.V. Makarova, V.S. Sultanov, V.B. Trusov. Experimental rationale for the use of ropren for the prevention of liver damage caused by isoniazid. Tuberculosis and lung disease. 2014; (7): 47-53. (in Russian)
6. V. Erokhin, I.A. Panacek, N.V. Adamovich. Clinical and morphological criteria of drug-induced hepatitis in pulmonary tuberculosis patients. The problem of tuberculosis. 1991; 1: 35-9. (in Russian)
7. K.S. Kazakov, A.A. Kalanchondzaev, M.I. Kozarez. Frequency and nature of side effects of anti-TB chemotherapy. The problem of tuberculosis. 1991; 12: 28-31. (in Russian)
8. D.A. Ivanov, S.E. Borisov. Risk assessment and monitoring of hepatotoxic reactions in patients with tuberculosis. Tuberculosis and lung disease. 2017; 95 (9): 40-8. (in Russian)
9. D.A. Ivanov, S.E. Borisov. Cancel or wait?: indications for withdrawal of anti-TB drugs in case of adverse reactions. Tuberculosis and lung disease. 2018; 96 (2): 47-54. (in Russian)
10. V.Yu. Mishin. Medical complications of combined chemotherapy of pulmonary tuberculosis. M.: Medical information Agency; 2007. (in Russian)
11. S.D. Podymova. Ademetionine: pharmacological effects and clinical application of the drug. BC. 2010; 18 (13): 800-5. (in Russian)
12. E.V. Biron, M.V. Kalinina. Medicinal liver lesions in patients with tuberculosis and the possibility of their correction. Pharmateca, 2013; 4: 84-92. (in Russian)
13. RD 64-126-91 «Preclinical safety assessment rules for pharmacological agents (GLP)». Moscow; 1991. (in Russian)
14. T.A. Gus kova. Features of preclinical toxicological study of antibacterial agents. Pharmacology and toxicology. 1985; XLVIII (3): 119-122 (in Russian)
15. About measures for further improvement of organizational forms of work with use of experimental animals. Available at: <http://www.vita.org.ru/exper/order-peotrovsky.htm>. (in Russian)
16. About the approval of rules of good laboratory practice: the order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation of April 01, 2016 No. 199n. Available at: <http://www.docscntd.ru/document/420350679>. (in Russian)
17. D.S. Sukhanov. Antioxidant properties of remaxol, reamberin and ademetionine in medicinal liver lesions in patients with anti-tuberculosis therapy. Experimental and clinical pharmacology. 2013; 76 (4): 45-8. (in Russian)
18. D.S. Sukhanov, T.I. Vinogradova, N.V. Zabolotnykh, M.L. Vitovskaya, A.L. Kovalenko. Hepatotropic action of runihole and ademetionine in liver damage with anti-TB drugs of the main range in the experiment. Archives of pathology. 2014; 76 (2): 26-31. (in Russian)
19. D.S. Sukhanov, E.B. Artyushkova, V.T. Dudka, S.V. Okoviti. The efficiency of remaxol and ademetionine in the combined experimental liver damage with the reserve series of anti-tuberculosis drugs and alcohol. Tuberculosis and lung disease. 2014; № (4): 59-63. (in Russian)
20. I.P. Kondrakhin. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: Handbook. M.: Kolos; 2004. (in Russian)
21. P.K. Yablonsky, red. Phthisiology. National clinical guidelines. M.: GEOTAR-Media, 2016. (in Russian)
22. N.I. Portanay, V.V. Sokolovsky, B.G. Osipenko. Biochemical studies in toxicological experiment. Irkutsk: ISU; 1990. (in Russian)
23. P.A. Akimov, A.G. Orbidans, G.A. Terekhin, A.N. Terekhina. The effect of alcohol intoxication on the content of glycogen in the liver and skeletal muscles. Pathological physiology and experimental therapy. 2010; 2: 15-7. (in Russian)
24. S. Glantz. Medical and biological statistics. M.: Practice, 1999. (in Russian)
25. K.I. Usov, T.A. Gus'kova, G.G. Yushkov, A.V. Mashanov, A.A. Gushina. Influence of chronobiological rhythms on the toxicity of isoniazid and rifampicin in combined application in experiment on rats. Toxicological Review. 2017; 4: 24-33. (in Russian)

K.I. Usov¹, T.A. Gus'kova², G.G. Jushkov³, L.P. Grishina³, A.S. Gushchin⁴

EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF SUPPORTIVE THERAPY WITH ADEMATIONINE FOR THE REDUCTION OF HEPATOTOXIC REACTIONS TO ANTITUBERCULOSIS DRUGS

¹Angarsk State Technical University, 665835, Angarsk, Russian Federation

²M.V.Dorogov Yaroslavl Center for the Transfer of Pharmaceutical Technologies, K.D.Yaroslavl State Pedagogical University, 150010, Yaroslavl, Russian Federation

³Irkutsk Regional Pathology and Autopsy Bureau, 664079, Irkutsk, Russian Federation

⁴Joint-Stock Company «Pharmasyntez», 664007, Irkutsk, Russian Federation

The article presents the results of experimental toxicological studies on justification of ademetionine supportive therapy in order to prevent toxic liver damage when using antituberculosis drugs.

Keywords: hepatotoxicity, adverse reactions, hepatoprotector, ademetionine, antituberculosis drugs, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, ethambutol, chemotherapy, supportive therapy.

Материал поступил в редакцию 12.10.2018 г.