

На правах рукописи

БУГАЕВ
Петр Андреевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ ПЕЧЕНИ
ПРОИЗВОДНЫМИ ГИДРАЗИНА**

14.03.04 – токсикология

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научные руководители:

Башарин Вадим Александрович – доктор медицинских наук профессор, начальник кафедры военной токсикологии и медицинской защиты ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России

Антушевич Александр Евгеньевич – доктор медицинских наук профессор, старший научный сотрудник НИЛ (военной терапии) НИО (экспериментальной медицины) НИЦ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России

Официальные оппоненты:

Сарманаев Салават Хамитович – доктор медицинских наук профессор, заведующий кафедрой токсикологии и клинической фармакологии Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, заместитель заведующего Токсикологическим центром ФМБА России

Оковитый Сергей Владимирович – доктор медицинских наук профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России

Ведущая организация:

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

Защита диссертации состоится «20» марта 2020 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.11 в ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова» МО РФ

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук доцент

Язенков Аркадий Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Токсические поражения печени – это группа заболеваний, связанных с гепатотоксическим действием различных химических веществ, вызывающих морфологические изменения ткани органа и связанные с ними функциональные нарушения (Антоненко О.М., 2013). Высокая чувствительность печени к химическим веществам обусловлена её ведущей ролью в их метаболизме (Куценко С.А., 2004). При биотрансформации токсикантов возможно образование высокореактивных промежуточных продуктов и инициация свободнорадикального окисления, вследствие чего может возникать поражение печени (Бакиров А.Б. и др., 2016).

Клинически токсические поражения печени могут проявляться как бессимптомным кратковременным изменением биохимических показателей крови, так и формированием печёночной недостаточности различной степени тяжести (Есауленко Е.Е., 2014; Бакиров А.Б. и др., 2016). К веществам, способным вызывать поражения печени при поступлении в организм человека и животных, относятся более 40 групп химических веществ. Среди них значительное место занимают производные гидразина, которые используются в химической промышленности, в качестве компонентов ракетных топлив, а также лекарственных средств (Мышкин В.А. и др., 2011).

В связи с интенсивной ракетно-космической деятельностью актуальными остаются отравления компонентами жидких ракетных топлив, в частности несимметричным диметилгидразином (НДМГ, гептил) (Лавриненко И.А. и др., 2012; Сарманаев С.Х. и др. 2014; Иванова Л.А., 2015). НДМГ используется на межконтинентальных баллистических ракетах, ракетах-носителях, в двигательных установках пилотируемых кораблей и автоматических спутников (Иванова Л.А., 2015). У лиц, контактирующих в процессе профессиональной деятельности с гептилом, могут возникать патологические изменения в печени (Yang R. et al., 2005; Лавриненко И.А. и др., 2012; Иванова Л.А., 2015). Почти у 50 % обследованных ликвидаторов баллистических ракет отмечались различные проявления поражений печени: жировой гепатоз, гепатомегалия, повышение активности трансаминаз и уровня провоспалительных цитокинов в крови (Шмакова Т.В. и др., 2006).

В настоящее время не теряют актуальность и поражения печени вследствие употребления лекарственных средств. В Российской Федерации острые лекарственные поражения печени были выявлены у 2,7% госпитализированных больных. Доказано, что развитие токсических гепатопатий могут вызывать свыше 290 различных препаратов, таких как противотуберкулёзные средства, психотропные, нестероидные противовоспалительные средства и другие (Daly A.K., 2010; Мышкин В.А. и др., 2011; Оковитый С.В., 2015).

Согласно данным литературы, противотуберкулёзный препарат изониазид вызывает острый гепатоцеллюлярный некроз у 20 % пациентов (Суханов Д.С. и др., 2012). Токсические гепатопатии, как правило, развиваются в течение первых трёх месяцев применения препарата, клинические признаки гепатита отмечаются в 0,1 % случаев. Частота и тяжесть токсических поражений печени возрастает при комбинации изониазида с рифампицином, вследствие индукции рифампицином цитохрома P₄₅₀ (Суханов Д.С. и др., 2012). По некоторым данным, у больных туберкулёзом, получавших в качестве лечения комбинацию изониазида с рифампицином, в 3,8 % случаев развивались лекарственно-индуцированные поражения печени (Gaude G.S., 2015).

Таким образом, сохраняется высокая вероятность возникновения поражений печени,

вызванных производными гидразина, на объектах, где возможен контакт с жидкими ракетными топливами, а также у пациентов, получающих противотуберкулёзную терапию, что объясняет необходимость совершенствования подходов к их фармакотерапии.

В последнее время всё большее внимание уделяется гепатозащитным препаратам из группы пептидных соединений, в частности, имеются публикации, свидетельствующие о гепатозащитном эффекте отечественных препаратов на основе дисульфида глутатиона (Васильева С.Н., 2004; Гребенюк А.Н. и др., 2014; Антушевич А.Е. и др., 2017). Учитывая, что данные препараты обладают антиоксидантной активностью (Антушевич А.Е. и др., 2014), целесообразно провести оценку их эффективности при поражениях печени производными гидразина, так как, по мнению ряда авторов, механизм токсического поражения печени этими токсикантами обусловлен активацией перекисного окисления липидов и возникновением оксидативного стресса (Hussain S.M. et al., 2002; Киселёв М.Ф. и др., 2009; Лавриненко И.А. и др., 2012).

Степень разработанности темы. При острых отравлениях несимметричным диметилгидразином применение табельного антидота пиридоксина гидрохлорида не в полной мере предотвращает развитие у отравленных поражений печени (Криницын Н.В. и др., 2011). Препарат влияет на ведущий механизм токсического действия производных гидразина – угнетение синтеза пиридоксальфосфата в тканях, в то время как гепатотоксическое действие обусловлено преимущественно образованием свободных радикалов и усилением процессов перекисного окисления липидов (Венгеровский А.И. и др., 1989; Куценко С.А., 2004; Мышкин В.А. и др., 2011). В связи с этим целесообразным является включение в терапию отравлений НДМГ гепатопротекторных средств, обладающих антиоксидантной активностью.

В последние годы проводятся исследования по поиску новых препаратов, обладающих гепатозащитным действием. Среди таких препаратов большое внимание уделяется пептидным соединениям на основе дисульфидов глутатиона: глутамил-цистеинил-глицин динатрия (ГЦГДН) и инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (ИГЦГДН). В литературе имеются данные об эффективности ГЦГДН в качестве средства сопровождения лучевой и химиотерапии онкологических заболеваний (Филатова Е.И. и др., 2010; Манихас Г.М. и др., 2012; Антушевич А.А. и др., 2013). Кроме того, препарат оказался эффективным в комплексной терапии туберкулёза, что проявляется в устранении антибиотикорезистентности микобактерий (Антушевич А.Е. и др., 2005) и снижении гепатотоксических эффектов противотуберкулёзных препаратов (Соколова Г.Б. и др., 2002; Васильева С.Н., 2004; Синицын М.В. и др., 2010; Еремеев В.В. и др., 2013).

Исследования ИГЦГДН доказали его эффективность в терапии хронических вирусных гепатитов В и С, острых крайне тяжёлых отравлений этанолом (Бузанов Д.В. и др., 2016; Антушевич А.Е. и др., 2017; Халютин Д.А. и др., 2017), герпесвирусной инфекции как самостоятельно, так и в комплексе с противовирусными средствами (Степанов А.В. и др., 2014), а также в профилактике и лечении химиолучевых стоматитов и мукозитов у онкологических больных (Ярцева А.А., 2015; Антушевич А.Е. и др., 2017). Однако оценка эффективности препарата в качестве средства фармакологической коррекции токсических поражений печени, возникающих при острых отравлениях гептилом и продуктами его распада, до настоящего времени не осуществлялась. Кроме того, интерес представляет, как наличие в составе ИГЦГДН пуринового компонента инозина повлияет на его

гепатозащитную эффективность в сравнении с однокомпонентным препаратом ГЦГДН при поражениях печени, вызванных приёмом противотуберкулёзных препаратов.

Цель исследования. Исследование эффективности препаратов пептидной природы на основе окисленной формы глутатиона при токсических поражениях печени, вызванных производными гидразина.

Задачи исследования:

1. Изучить особенности поражения печени при остром крайне тяжёлом отравлении несимметричным диметилгидразином в эксперименте.

2. На экспериментальной модели токсического гепатита, вызванного несимметричным диметилгидразином, провести оценку эффективности гепатозащитного действия инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и его комбинации с пиридоксина гидрохлоридом.

3. Провести сравнительную оценку гепатозащитной эффективности препаратов на основе окисленного глутатиона (глутамил-цистеинил-глицина динатрия) и органической соли дисульфида глутатиона и инозина (инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия) на модели токсического гепатита, вызванного комбинацией противотуберкулёзных средств – производного гидразина (изониазида) с рифампицином и пиразинамидом.

Научная новизна исследования. Впервые показана эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия при остром отравлении НДМГ. Профилактическое введение ИГЦГДН значительно снижало летальность крыс при введении НДМГ в среднесмертельной дозе. Использование пиридоксина гидрохлорида в монотерапии устраняло гибель отравленных НДМГ животных, но не предотвращало развитие у них токсических поражений печени.

Совместное применение препаратов ИГЦГДН и пиридоксина гидрохлорида оказывало наиболее выраженное гепатозащитное действие. У крыс, получавших данную комбинацию препаратов, отмечены наименьшая выраженность биохимических сдвигов в крови, характеризовавших поражение печёночной паренхимы, а также снижение тяжести поражения клеток печени по данным морфометрии гистологических препаратов.

Показано, что глутамил-цистеинил-глицин динатрия и инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия снижают тяжесть развивающихся токсических морфофункциональных изменений в печени, вызванных противотуберкулёзными препаратами, при этом эффект от использования ИГЦГДН оказался более выраженным.

Исследованы возможные механизмы гепатопротекторного действия препаратов ГЦГДН, ИГЦГДН, а также комбинации ИГЦГДН с пиридоксина гидрохлоридом. Показано, что исследуемые препараты снижают выраженность оксидативного стресса в тканях печени при поражениях производными гидразина.

Теоретическая и практическая значимость. В результате проведённого экспериментального исследования научно обоснована целесообразность применения пиридоксина гидрохлорида в комбинации с инозина глицил-цистеинил-глутаматом динатрия при остром тяжёлом отравлении несимметричным диметилгидразином и ИГЦГДН при поражениях печени противотуберкулёзными препаратами (изониазидом в комплексе с рифампицином и пиразинамидом).

Установлено, что препараты инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия и глутамил-цистеинил-глицин динатрия снижают выраженность поражений печени при

отравлениях производными гидразина, уменьшают интенсивность перекисного окисления липидов в клетках печени, что свидетельствует об их антиоксидантной активности.

Выявлено, что включение инозина в состав ИГЦГДН способствует повышению эффективности окисленного глутатиона при токсических поражениях печени, вызванных противотуберкулёзными препаратами.

Практическая значимость работы заключается в апробации различных схем введения пептидных препаратов на основе окисленного глутатиона для защиты печени от токсического воздействия производных гидразина.

Полученные данные об эффективности пептидных гепатопротекторов при поражениях печени НДМГ и противотуберкулёзными препаратами позволяют рекомендовать дальнейшее экспериментальное и клиническое изучение этих средств для возможности включения их в схемы профилактики и лечения токсических гепатитов при отравлениях производными гидразина.

Методология и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на базе кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ.

Методология исследования включала в себя анализ литературы по теме диссертации, построение научной гипотезы, постановку цели и задач работы, планирование этапов исследования, сбор, обработку, анализ и обобщение материала, формулировку выводов и практических рекомендаций.

Объектом исследования являлись белые беспородные крысы-самцы, на которых моделировали поражения печени при остром крайне тяжёлом отравлении НДМГ в дозе ЛД₅₀, а также поражения печени в результате двухнедельного введения противотуберкулёзных препаратов: производного гидразина – изониазида в комплексе с рифампицином и пиразинамидом. На модели поражения печени при остром крайне тяжёлом отравлении НДМГ оценивали гепатозащитную эффективность препарата ИГЦГДН в монотерапии и в комбинации с антидотом – пиридоксина гидрохлоридом. На модели поражения печени противотуберкулёзными средствами проводили сравнительную оценку эффективности пептидных препаратов: монокомпонентного – ГЦГДН и двухкомпонентного – ИГЦГДН. Методология исследования базировалась на требованиях нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных и гуманному отношению к ним. Работа выполнена с использованием современных методов исследования и обработки данных.

На проведение экспериментального исследования получено разрешение локального независимого этического комитета при Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (протокол № 169 от 22 декабря 2015 года).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Однократное внутривентральное введение крысам несимметричного диметилгидразина в среднесмертельной дозе приводило к формированию токсического гепатита на 7-е сутки эксперимента, что проявлялось биохимическими и морфологическими нарушениями в печени.

2. Препараты инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия и пиридоксина гидрохлорид при их совместном применении оказывали гепатозащитное действие, уменьшая выраженность токсических морфофункциональных нарушений печени при остром

отравлении несимметричным диметилгидразином.

3. Комбинированный пептидный препарат инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в сравнении с препаратом глутамил-цистеинил-глицином динатрия оказывает более выраженное защитное действие при поражении печени, вызванном комбинацией противотуберкулёзных препаратов (изониазид, рифампицин, пипразинамид).

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности работы обусловлена достаточным количеством использованных в исследовании лабораторных животных, рандомизацией и формированием групп сравнения и контроля, адекватными методами исследования и статистической обработки.

Результаты проведённых исследований были опубликованы и обсуждены на: III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016 г.); Международной медико-биологической научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Первой всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Всеармейской научно-практической конференции, посвящённой 95-летию со дня рождения член-корреспондента РАМН профессора Г.И. Алексева «Актуальные вопросы военно-полевой терапии» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Всероссийском научном форуме студентов и молодых учёных «Студенческая наука – 2018» (Санкт-Петербург, 2018 г.); V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); Межвузовской научно-практической конференции «Актуальные вопросы безопасности жизнедеятельности и медицины чрезвычайных ситуаций», посвящённой 260-летию Сеченовского Университета (Москва, 2018).

Реализация результатов исследования. Полученные в ходе проведения работы теоретические и практические результаты реализованы в учебном процессе кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова для курсантов и студентов факультетов подготовки врачей, а также слушателей групп дополнительного профессионального образования.

Материалы работы использованы при составлении методических рекомендаций «Применение дисульфидов глутатиона в качестве средств профилактики и лечения токсических гепатитов и цирроза печени у военнослужащих при отравлении гепатотропными ядами», при выполнении научно-исследовательской работы (НИР) «Экспериментальное обоснование новых подходов к профилактике и лечению токсических гепатитов и цирроза печени у военнослужащих при отравлении гепатотропными ядами», шифр «Консерватория», № VMA 03.04.02.1618/0023; в разработке дизайна клинических исследований фармакологической активности дисульфидов глутатиона в лечении токсических гепатитов и фиброзов печени.

В процессе выполнения работы оформлено и принято к использованию рационализаторское предложение № 14393/5 от 10.11.2016 г.

Связь темы диссертации с плановой тематикой научно-исследовательской работы учреждения. Исследование проведено в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова: тема НИР № VMA 03.04.02.1618/0023 (шифр «Консерватория»).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 10 научных

работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание учёных степеней кандидата наук и доктора наук.

Личный вклад автора. Автором проведён сбор и анализ литературы по теме исследования, сформулированы цель и задачи, определены объём работы и объекты исследования, методики и их обоснование для решения поставленных задач. Проведены эксперименты по моделированию токсических поражений печени несимметричным диметилгидразином и комплексом противотуберкулёзных препаратов (изониазид, рифампицин, пиразинамид), а также фармакологической коррекции указанных нарушений у лабораторных животных. Сформирована база данных, осуществлена статистическая обработка, обобщение и обсуждение полученных результатов, оформлена диссертация и автореферат, подготовлены научные публикации по теме исследования. Доля участия автора в получении и накоплении результатов – 90 %, в статистической обработке – 100 %.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, включает 27 таблиц, 2 схемы и 9 рисунков. Состоит из введения, четырёх глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение), выводов, практических рекомендаций и библиографического списка литературы, включающего 193 источника (123 – на русском языке, 70 – на иностранных языках).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на базе кафедры военной токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова МО РФ на белых беспородных крысах-самцах в количестве 417 особей из питомника РАН «Рапполово» (пос. Рапполово, Ленинградская область). В качестве токсикантов в исследовании применяли: несимметричный диметилгидразин в дозе 115 мг/кг (ЛД₅₀) при однократном внутрибрюшинном введении; противотуберкулёзные препараты: изониазид 50 мг/кг/сут внутрибрюшинно, рифампицин 250 мг/кг/сут и пиразинамид в дозе 45 мг/кг/сут внутривенно при ежедневном введении в течение 14 суток.

Эффективность пептидных препаратов при поражениях печени производными гидразина исследовали в несколько этапов.

На первом этапе моделировали поражение печени при однократном внутрибрюшинном введении НДМГ в дозе ЛД₅₀; при ежедневном введении противотуберкулёзных препаратов в указанных выше дозах в течение 14 дней.

На втором этапе изучали эффективность пептидного гепатопротектора инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и антидота – пиридоксина гидрохлорида при остром крайне тяжёлом отравлении несимметричным диметилгидразином как по отдельности, так и в их комбинации. Оценивали летальность отравленных животных, наличие и выраженность судорожного синдрома, биохимические показатели крови, состояние плазменно-коагуляционного гемостаза, состояние паренхимы печени по гистологическим срезам, а также активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояние системы глутатиона в её гомогенатах.

На третьем этапе оценивали гепатозащитные эффекты пептидных препаратов инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и глутамил-цистеинил-глицин динатрия на модели

поражения печени изониазидом в комплексе с рифампицином и пиразинамидом по биохимическим показателям крови, печёночному коэффициенту, гистологическим срезам паренхимы органа и активности ПОЛ в её гомогенатах.

Для изучения поражений печени при остром крайне тяжёлом отравлении НДМГ вещество разводили 0,9% раствором натрия хлорида в соотношении 1:19. Полученный раствор вводили крысам внутривентриально однократно инсулиновым шприцом в дозе 115 мг/кг. Эта доза была получена экспериментально и соответствовала ЛД₅₀.

Поражения печени противотуберкулёзными препаратами (изониазид в комбинации с рифампицином и пиразинамидом) моделировали по схеме Ю.И. Сливки (Сливка Ю.И., 1989). Изониазид (гидразид изоникотиновой кислоты) – официальный раствор для инъекций, вводили крысам внутривентриально в дозе 50 мг/кг/сут. Рифампицин (250 мг/кг/сут) и пиразинамид (45 мг/кг/сут) вводили животным внутривентриально. Для этого содержимое капсул рифампицина и таблетки пиразинамида размешивали с дистиллированной водой при помощи магнитной мешалки. Все препараты вводили ежедневно в течение 14 суток.

Используемые для фармакологической коррекции токсических поражений печени препараты вводили по следующим схемам:

1. При остром крайне тяжёлом отравлении НДМГ: ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг внутривентриально через 30 минут после введения токсиканта, затем ежедневно со 2-х по 7-е сутки внутривентриально в той же дозе (схема I), в дозе 30 мг/кг внутривентриально за 2 часа до введения токсиканта, затем ежедневно со 2-х по 7-е сутки внутривентриально в той же дозе (схема II). Препарат ИГЦГДН применяли как в монотерапии, так и в комбинации с пиридоксина гидрохлоридом (50 мг/кг внутривентриально однократно через 30 минут после введения токсиканта).

2. При поражении печени противотуберкулёзными препаратами: ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг внутривентриально ежедневно в течение 14 суток за 2 часа до введения противотуберкулёзных препаратов; ГЦГДН в дозах 20 и 40 мг/кг – ежедневно в течение 14 суток за 2 часа до введения противотуберкулёзных препаратов.

Все используемые препараты вводили крысам в объёме не более 5 мл. Животные контрольных групп (без лечения) получали 0,9% раствор NaCl в равном объёме.

После введения токсиканта у лабораторных животных оценивали общее состояние (внешний вид, поведение, потребление воды и пищи), наличие и выраженность судорожного синдрома, а также летальность. Судорожный синдром оценивали по следующим критериям: наличие, время возникновения после введения токсиканта, характер судорог (клонические, тонические, клонико-тонические), количество и продолжительность судорожных приступов. Летальность отравленных крыс оценивали на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е суток. Показатель выражали в количестве погибших животных и в процентах от общего числа в группе. Значимость различий между группами оценивали по точному критерию Фишера.

Для определения относительной массы печени (печёночного коэффициента) у крыс после проведения эвтаназии извлекали печень, производили её взвешивание на весах «ВЛ-220С» (НПП «Госметр», Россия), показатель выражали в процентах от массы тела животного.

Определение в плазме крови биохимических показателей: активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гамма-

глутамилтранспептидазы и лактатдегидрогеназы; концентрации общего белка, альбумина, общего билирубина, креатинина, глобулина, мочевины, глюкозы проводили на автоматическом биохимическом анализаторе «Mindray BS-120» (Китай) при помощи набора реактивов фирмы «Ольвекс» (Россия).

Оценку состояния плазменно-коагуляционного гемостаза проводили с использованием специальных микрокувет и реагентов производства ООО «Эмко» (Россия) на анализаторе «АПГ2-02-П» (Россия) оптическим методом. Определяли следующие показатели: частичное (активированное) тромбoplastиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновый индекс (ПТИ), протромбиновое отношение (ПО), процентное содержание протромбина по Квику, содержание фибриногена и международное нормализованное отношение (МНО).

Для оценки интенсивности протекания процессов перекисного окисления липидов в печени при интоксикациях производными гидразина определяли концентрации диеновых конъюгатов по методике И.Д. Стальной (Стальная И.Д., 1977) и малонового диальдегида по методу М. Uchiyama (Michara M. et al., 1978) в гомогенатах ткани органа.

Состояние системы антиоксидантной защиты в ткани печени оценивали путём определения в её гомогенатах содержания восстановленного глутатиона с использованием 5,5 – дитио-бис(-2-нитробензойной) кислоты (ДТНБ) по методике G.L.Ellman (1959); активности ферментов: глутатионпероксидазы – по методу А.Р. Гавриловой (Гаврилова А.Р. и др., 1986), каталазы – по методу М.А. Королюка (Королюк М.А., 1988), супероксиддисмутазы – по методу В.А. Костюка и соавторов (Костюк В.А. и др., 1990), сульфгидрильных групп – по методу G.Bellomo и соавторов (Bellomo G. et al., 1990), глутатионредуктазы – по методу I.Carlberg и B.Mannervik (Carlberg I. et al., 1985), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – по методу А.Kornberg и соавторов (Kornberg A. et al., 1955), глутатион-S-трансферазы – по методу W.H.Nabig и W.B.Jakoby (Nabig W.H. et al., 1981). Концентрацию белка в гомогенатах печени определяли методом Лоури в модификации G.L.Peterson (Peterson G.L., 1983).

Для морфогистологического исследования после проведения эвтаназии у животных извлекали печень, фиксировали в 10 % забуференном формалине производства «БиоВитрум» (Россия), затем проводили спиртовое обезвоживание и заливали в парафин по стандартной методике приготовления гистологических препаратов (Меркулов Г.А., 1969). Морфометрическому анализу подвергали типовые патологические изменения, выявленные при гистологическом исследовании: вакуольная дистрофия гепатоцитов, белковая дистрофия гепатоцитов с формированием глубоких дегенеративных изменений цитоплазмы, а также крайняя степень выраженности дегенеративных изменений гепатоцитов в виде кариолизиса. Подсчитывалось абсолютное содержание клеток с подобными изменениями в пересчете на 1 мм² среза ткани паренхимы. Измерения выполняли визуально в проходящем свете при суммарном увеличении микроскопа ×400, использовали бинокулярный исследовательский микроскоп Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия) и прикладную программу получения и анализа изображений Zen (Carl Zeiss, Германия).

Данные, полученные в ходе экспериментальных исследований, были обработаны в программах «Microsoft Office Excel 2010», «Statistica 5.0, 10.0». Выборка для каждой экспериментальной группы животных составляла не менее 6 особей. Определение среднелетальных доз проводили при помощи пробит-анализа по Финни. Полученные

данные, распределённые по закону отличного от нормального, анализировали при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни, критерия Краскела-Уолиса и критерия Ньюмана-Кейлса для множественных попарных сравнений. Оценку значимости различий средних значений показателей выживаемости в экспериментальных группах производили с использованием точного метода Фишера. Вывод о статистической значимости различий между группами принимали при $p < 0,05$ (Гланц С., 1998).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При моделировании поражений печени несимметричным диметилгидразином животным внутрибрюшинно вводили токсикант в дозе 115 мг/кг (ЛД₅₀). У крыс оценивали наличие и характер судорог и время их гибели. Гибель 50 % отравленных животных наблюдалась в первые сутки эксперимента. Летальных исходов в более поздние сроки при интоксикации исследуемым производным гидразина не было. При этом у 100 % отравленных НДМГ животных развивался судорожный синдром в течение первых 2-х – 6-ти часов после введения токсиканта. Судороги провоцировались громкими звуками, ярким светом и механическим раздражением.

НДМГ вызывал у крыс окислительную деграцию клеточных мембран, о чём свидетельствовала активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках печени экспериментальных животных. Установлено, что уже через 1 час после введения токсиканта регистрировалось статистически значимое повышение концентрации МДА (с $125,5 \pm 6,2$ нмоль/г ткани в интактной группе до $176,3 \pm 5,1$ нмоль/г ткани у отравленных крыс), которое сохранялось высоким (более 165 нмоль/г ткани) в течение всего срока исследования. Этому способствовали нарушения в системе антиоксидантной защиты гепатоцитов (уже в первые часы после отравления крыс). Так, отмечено статистически значимое снижение уровня ВГ. Наиболее выраженное (с $12,69 \pm 0,54$ ммоль/г ткани в интактной группе до $8,78 \pm 0,67$ ммоль/г ткани у отравленных крыс) снижение уровня трипептида регистрировалось через 3 часа после введения ксенобиотика. На 7-е сутки, несмотря на некоторое увеличение содержания ВГ ($10,38 \pm 0,43$ ммоль/г ткани), его уровень был значимо ниже, чем у интактных животных. НДМГ при введении в дозе ЛД₅₀ также приводил к снижению содержания сульфгидрильных групп (СГ) в тканях печени. Этот эффект сохранялся в течение 1-х суток после введения токсиканта. На 7-е сутки содержание СГ было также значимо ниже ($p < 0,05$), чем у интактных животных. Это указывает на выраженное нарушение тиол-дисульфидного равновесия в тканях печени, где наиболее интенсивно идет процесс биотрансформации яда.

При морфогистологическом исследовании уже на 3-и сутки наблюдались признаки токсического поражения печени, характеризовавшиеся выраженным жировым гепатозом, что на гистологических препаратах проявлялось в виде вакуольной дистрофии паренхимы органа. В этот же срок начинали формироваться дегенеративные изменения. В дальнейшем, на 7-е сутки после введения НДМГ, выраженность патологических изменений в печени крыс увеличивалась, при этом отмечалось изменение характера данных поражений: если на 3-и сутки основным проявлением токсической гепатопатии являлась вакуольная дистрофия, то на 7-е сутки она не обнаруживалась, при этом отмечались нарушения балочного строения печени, тяжёлые дегенеративные изменения гепатоцитов в виде обширных полей клеток с зернистостью и неравномерным просветлением цитоплазмы, а также кариолизисом.

На 7-е сутки эксперимента морфологические сдвиги проявлялись также в нарушении биохимических процессов в ткани печени (рисунок 1).

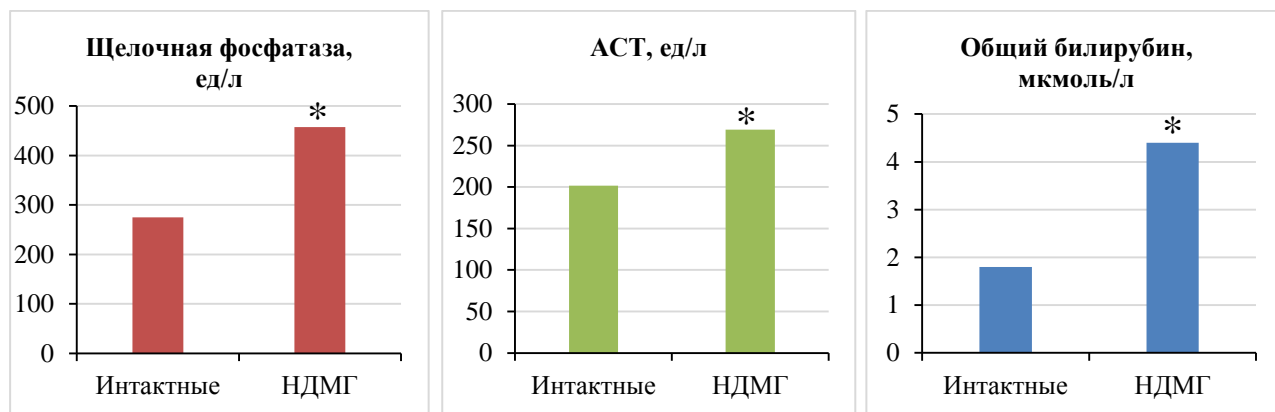


Рисунок 1 – Изменения в биохимических показателях крови на 7-е сутки после введения НДМГ в дозе ЛД₅₀.

* – различия по сравнению с интактной группой значимы ($p < 0,05$).

Так, в данный период введение токсиканта вызывало увеличение активности щелочной фосфатазы с $274,5 \pm 20,5$ ед/л (у интактных животных) до $457,3 \pm 57,9$ ед/л (у крыс после интоксикации НДМГ), активность АСТ – с $201,8 \pm 15,7$ ед/л до $269,4 \pm 20,6$ ед/л, концентрация общего билирубина – с $1,8 \pm 0,06$ мкмоль/л до $4,4 \pm 0,8$ мкмоль/л соответственно, что являлось проявлением цитолитического синдрома в печени.

Кроме того, НДМГ оказал повреждающее действие на свёртывающую систему крови, что проявилось в значимом снижении ПТИ и повышении МНО. Выявленные изменения могли быть следствием снижения содержания в плазме крови протромбина, на что косвенно указывают данные расчёта показателя по Квику ($54,4 \pm 1,56\%$ у отравленных НДМГ против $71,8 \pm 2,60\%$ у интактных животных).

Таким образом, НДМГ при однократном внутрибрюшинном введении в среднесмертельной дозе приводил к развитию у крыс токсических поражений печени, о чём свидетельствуют данные морфологических исследований и изменения биохимических показателей.

Напомним, что фармакологические препараты, в частности производное гидразина – изониазид обладают гепатотоксическими свойствами, что в условиях длительного их применения может приводить к формированию токсического гепатита. В связи с этим в дальнейших исследованиях моделировали поражение печени в результате воздействия противотуберкулёзных препаратов (ПП): изониазида в комбинации с рифампицином и пиперазидом. На 15-й день эксперимента у животных оценивали выраженность изменений в печени.

В результате морфогистологического исследования печени у крыс, получавших ПП, были выявлены полиморфные патологические изменения в паренхиме: балочное строение было частично сохранено лишь в некоторых образцах, при этом отсутствовало в обширных участках с выраженными дегенеративными (вплоть до некробиотических) изменениями гепатоцитов в виде расширения, базофилии и комковатости цитоплазмы, литических изменений ядер. Описанные изменения имели как очаговый, так и более распространённый

характер, отмечались в цетролобулярных и перипортальных отделах печёночной долики.

Выраженные гепатотоксические изменения проявлялись также в статистически значимом (в 1,3 раза) повышении относительной массы печени (печёночного коэффициента) по сравнению с аналогичным показателем интактной группы.

При оценке биохимических показателей крови у крыс при введении противотуберкулезных средств выявлено повышение концентрации общего билирубина в сыворотке крови в 8,34 раза по сравнению с интактными животными.

Кроме того, у животных, получавших ПП, регистрировалось повышение показателей активности процессов перекисного окисления липидов в печени (рисунок 2).

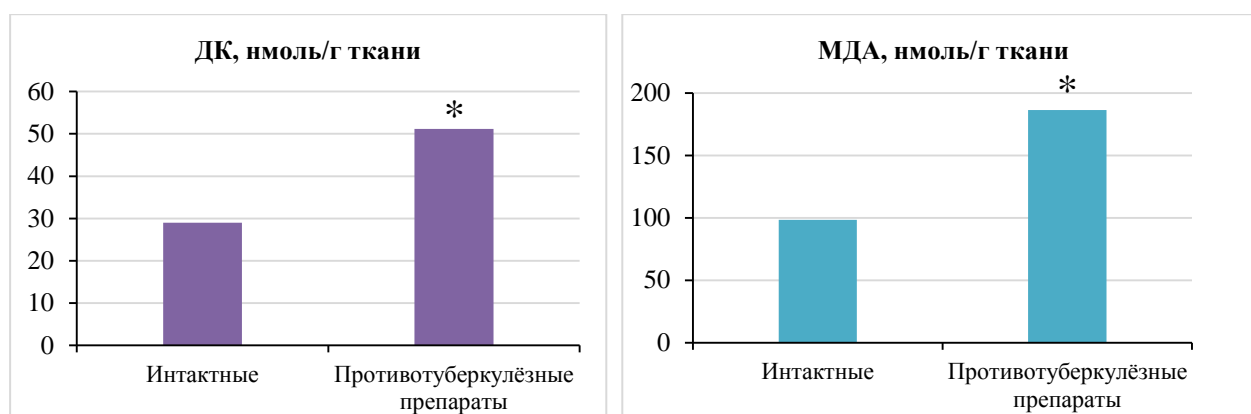


Рисунок 2 – Изменения в показателях активности ПОЛ в гомогенатах печени крыс после ежедневного введения противотуберкулёзных препаратов, 15-й день эксперимента.

* – различия по сравнению с интактной группой значимы ($p < 0,05$).

Установлено, что содержание ДК и МДА в гомогенатах печени крыс, получавших противотуберкулезные средства, значимо превышало аналогичные показатели интактной группы: ДК – в 1,77 раза, а МДА – в 1,89 раза.

Таким образом, применение комплекса противотуберкулезных препаратов в описанной выше схеме приводило к возникновению у крыс поражений печени. Учитывая тот факт, что лечение туберкулёза является длительным процессом, и при этом высока вероятность развития у пациентов токсических поражений печени, возникает необходимость введения в схемы лечения гепатопротекторных средств.

На втором и третьем этапах работы проводили оценку гепатозащитной эффективности препаратов на основе пептида – окисленного глутатиона на моделях поражения печени, вызванных НДМГ и противотуберкулёзными препаратами (изониазид, рифампицин, пиразинамид) соответственно.

Учитывая, что при острых отравлениях НДМГ в схему оказания медицинской помощи входит антидот – витамин В₆, была проведена экспериментальная оценка эффективности пептидного препарата инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия (ИГЦГДН) в условиях его совместного применения с пиридоксина гидрохлоридом.

Данное исследование состояло из двух серий экспериментов, где ИГЦГДН вводился по двум схемам: в дозе 30 мг/кг внутривнутрибрюшинно через 30 минут после введения токсиканта, затем ежедневно со 2-х по 7-е сутки внутривнутрибрюшинно в той же дозе (схема I); в дозе 30 мг/кг внутривнутрибрюшинно за 2 часа до введения токсиканта, затем ежедневно со 2-х по 7-е сутки внутривнутрибрюшинно в той же дозе (схема II).

Исследование эффективности ИГЦГДН при введении по схеме I проведено на 102 крысах, которые были разделены на 5 групп: 1-я группа (n=18) – интактные животные; 2-я группа (n=24) – НДМГ (без фармакологической коррекции); 3-я группа (n=18) – НДМГ + пиридоксин; 4-я группа (n=24) – НДМГ + ИГЦГДН (схема I); 5-я группа (n=18) – НДМГ + пиридоксин + ИГЦГДН (схема I).

В ходе эксперимента оценивали летальность, наличие и характер судорог, выраженность поражений печени, а также влияние на эти показатели исследуемых препаратов. Половина выживших животных подвергалась эвтаназии на 3-и сутки, вторая половина – на 7-е сутки. Определение активности ПОЛ в гомогенатах печени проводили на 3-и и 7-е сутки, морфогистологическое исследование паренхимы, а также определение относительной массы печени – только на 7-е сутки. Также на 7-е сутки производился забор крови для определения биохимических показателей и оценки состояния плазменно-коагуляционного гемостаза.

Пиридоксина гидрохлорид, введённый животным через 30 минут после НДМГ, предотвращал развитие у них судорожного синдрома, а также приводил к выживаемости всех крыс в группе. Использование ИГЦГДН в монотерапии не оказывало влияния на развитие судорог и летальность поражённых крыс.

Проведение морфогистологического исследования препаратов печени крыс показало, что у отравленных НДМГ животных без лечения отмечались патологические изменения, описанные выше. При этом у животных, получавших только пиридоксина гидрохлорид, также имели место подобные, однако менее выраженные поражения.

Наименее выраженные повреждения паренхимы печени были отмечены в группе, получавшей комбинацию ИГЦГДН с пиридоксина гидрохлоридом. Так, во всех образцах гистологических препаратов были сохранены структура и балочное строение, визуально менее выражены дегенеративные изменения гепатоцитов (рисунок 3).

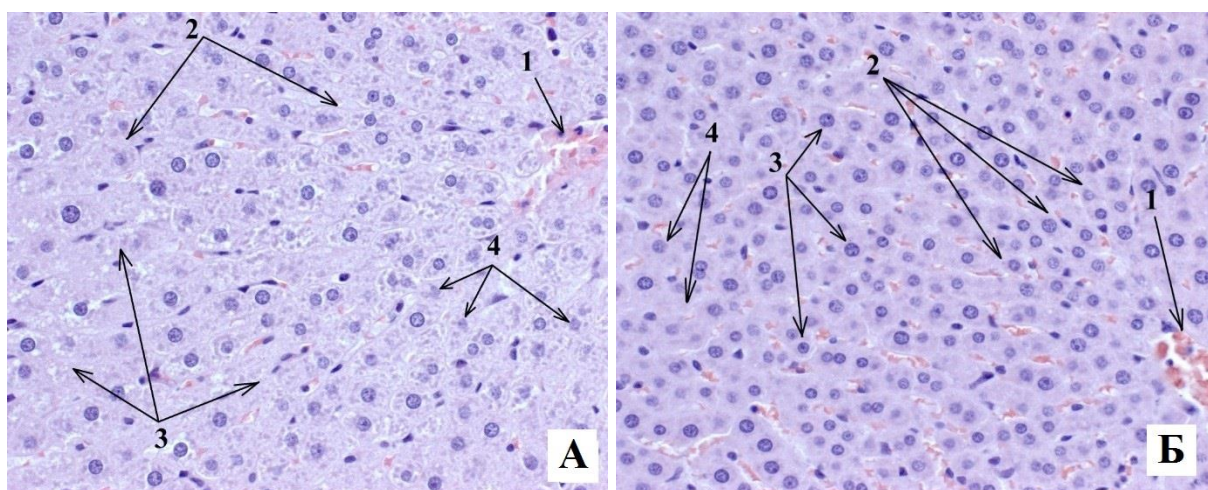


Рисунок 3 – Печень крысы через 7 суток после однократного введения НДМГ в дозе ЛД₅₀ без лечения (А) и крысы получавшей лечение пиридоксина гидрохлоридом и ИГЦГДН по схеме I (Б). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение × 400.

А: 1 – центральная вена; 2 – дисконплексация печёночных балок; 3 – дегенеративно изменённые гепатоциты; 4 – литически изменённые ядра гепатоцитов.

Б: 1 – центральная вена; 2 – сохранённое балочное строение; 3 – неизменённые гепатоциты; 4 – дегенеративно изменённые гепатоциты.

Результаты морфометрического исследования гистологических препаратов печени крыс после острого крайне тяжёлого отравления НДМГ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Морфометрические показатели в гистологических препаратах печени крыс через 7 суток после однократного введения НДМГ в дозе ЛД₅₀, кл/мм² среза, ($X \pm s_x$)

Показатель	Группа			
	НДМГ (n=6)	НДМГ + пиридоксин (n=9)	НДМГ + ИГЦГДН (схема I) (n=7)	НДМГ + пиридоксин + ИГЦГДН (схема I) (n=9)
Белковая дегенерация гепатоцитов	2519,2 ±49,94	1694,3 ±21,43 *	1243,6 ±30,44 *#	704,6 ±41,25 *#^
Кариолизис	1397,7 ±58,12	1122,8 ±23,21 *	1133,9 ±28,61 *	759,4 ±39,16 *#^
Примечание: * – различия по сравнению с группой «НДМГ» значимы ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с группой «НДМГ+пиридоксин» значимы ($p < 0,05$); ^ – различия по сравнению с группой «НДМГ+ИГЦГДН» значимы ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.				

Как видно из таблицы, введение пиридоксина гидрохлорида в монотерапии оказалось эффективным: в 1,5 раза по сравнению с группой «НДМГ» было снижено количество гепатоцитов с признаками белковой дегенерации, в 1,3 раза – количество гепатоцитов с признаками кариолизиса. ИГЦГДН при применении в монотерапии ещё более эффективно снижал выраженность поражений печени: гепатоцитов с белковой дегенерацией в данной группе было в 1,4 раза меньше по сравнению с показателем у животных, получавших лечение только пиридоксина гидрохлоридом. Наилучшие результаты по исследуемым показателям отмечены у крыс при комбинированной терапии пиридоксина гидрохлоридом и ИГЦГДН: гепатоцитов с белковой дегенерацией в срезах печени животных данной группы было в 3,6 раза меньше, чем у крыс без лечения, в 2,4 раза меньше, чем у получавших только пиридоксина гидрохлорид и в 1,8 раза меньше, чем у получавших только ИГЦГДН. Кроме того, среднее количество гепатоцитов с признаками кариолизиса в срезах печени крыс, получавших лечение комбинацией пиридоксина гидрохлорида с ИГЦГДН составило $759,4 \pm 39,16$ кл/мм², что в 1,8 раза меньше, чем у нелеченых животных, в 1,5 раза меньше, чем у животных из групп, получавших пиридоксина гидрохлорид и ИГЦГДН в монотерапии.

Определение относительной массы печени (печёночного коэффициента) показало, что у отравленных НДМГ животных без лечения показатель был статистически значимо (на 27 %) выше, по сравнению с интактными животными. У отравленных крыс, получавших только пиридоксина гидрохлорид, относительная масса печени была меньше, чем у не получавших лечение животных, но при этом значимо выше, чем у интактных. Печёночный коэффициент у животных, получавших ИГЦГДН как в монотерапии, так и в комбинации с пиридоксина гидрохлоридом, был значимо ниже, чем у крыс контрольной группы и практически не отличался от референтных значений.

На 7-е сутки после введения НДМГ исследовали биохимические показатели крови отравленных крыс (таблица 2).

Таблица 2 – Биохимические показатели крови крыс через 7 суток после однократного введения НДМГ в дозе ЛД₅₀, ($X \pm s_x$)

Показатель	Группа				
	Интактные (n=18)	НДМГ (n=6)	НДМГ + пиридоксин (n=9)	НДМГ + ИГЦГДН (схема I) (n=7)	НДМГ + пиридоксин + ИГЦГДН (схема I) (n=9)
Щелочная фосфатаза, ед/л	270,4 ±21,14	462,7 ±58,1 *	345,9 ±55,2	339,8 ±58,6	272,4 ±19,61 #
АСТ, ед/л	203,4 ±16,81	271,98 ±21,4 *	220,1 ±23,5	224,6 ±19,8	202,3 ±15,23 #
Общий билирубин, мкмоль/л	1,80 ±0,05	4,45 ±0,72 *	2,81 ±0,78	2,41 ±0,94	1,93 ±0,05 #
Примечание: * – различия по сравнению с интактной группой значимы ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с группой «НДМГ» значимы ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.					

Как видно из таблицы, значимые, по сравнению с группой «НДМГ», различия были отмечены только у животных, получавших комбинацию пиридоксина гидрохлорида с ИГЦГДН. В этой группе активность щелочной фосфатазы была ниже в 1,7 раза, АСТ – в 1,34 раза, концентрация общего билирубина – в 2,3 раза ниже по сравнению с группой «НДМГ». При этом следует отметить, что у животных, получавших пиридоксина гидрохлорид с ИГЦГДН, не отмечалось значимых изменений по вышеперечисленным показателям в сравнении с интактной группой, что также является подтверждением гепатозащитного эффекта данной комбинации препаратов.

В монотерапии препараты пиридоксина гидрохлорид и ИГЦГДН не оказывали влияния на биохимические показатели крови отравленных животных: в группах «НДМГ+пиридоксин» и «НДМГ+ИГЦГДН» они статистически не отличались от показателей интактных животных и животных группы «НДМГ», при этом наблюдалась тенденция к снижению по сравнению с группой «НДМГ» активности щелочной фосфатазы, АСТ и концентрации общего билирубина. По показателям концентрации общего белка, креатинина, альбумина, глобулина, мочевины; активности АЛТ и ГГТП статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Совместное применение пиридоксина гидрохлорида и ИГЦГДН приводило также и к нормализации состояния свёртывающей системы крови у отравленных НДМГ животных: по исследуемым показателям (АЧТВ, ТВ, ПТИ, ПО, процентное содержание протромбина по Квику, содержание фибриногена и МНО) у крыс, получавших комбинацию препаратов, отсутствовали статистически значимые различия с крысами интактной группы.

НДМГ, введённый крысам в среднесмертельной дозе, как уже было описано выше, вызывал у них активацию процессов ПОЛ в тканях печени, которая регистрировалась на 3-и и 7-е сутки эксперимента по достоверному повышению концентрации ДК и МДА (таблица 3).

Таблица 3 – Состояние перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс на 3-и и 7-е сутки после однократного введения НДМГ в дозе ЛД₅₀, ($X \pm s_x$)

Показатель	Группа				
	Интактные (n=18)	НДМГ (n=6)	НДМГ + пиридоксин (n=9)	НДМГ + ИГЦГДН (схема I) (n=7)	НДМГ + пиридоксин + ИГЦГДН (схема I) (n=9)
3-и сутки					
ДЖ, нмоль/г ткани	31,13 ±2,51	45,58 ±1,21 *	42,31 ±1,78 *	37,49 ±2,22 #	32,02 ±1,72 #
МДА, нмоль/г ткани	130,71 ±5,56	172,52 ±5,45 *	161,40 ±6,21 *	150,32 ±8,21	138,58 ±3,65 #
СОД, усл. ед/(мин×мг белка)	48,29 ±3,18	46,54 ±3,07	47,72 ±4,23	58,21 ±2,45 #	64,72 ±5,14 *#
Каталаза, мкмоль/(мин×г белка)	491,11 ±21,62	521,12 ±23,43	542,31 ±27,37	612,53 ±21,39 *#	647,55 ±24,45 *#
Глутатион- пероксидаза, ммоль/(мин×г белка)	5,86 ±0,21	4,98 ±0,51	4,74 ±0,23 *	6,20 ±0,15	8,21 ±0,95 #
7-е сутки					
ДЖ, нмоль/г ткани	31,13 ±2,51	47,96 ±2,81 *	41,54 ±1,11 *	38,91 ±2,12 #	34,15 ±1,24 #
МДА, нмоль/г ткани	130,71 ±5,56	169,11 ±4,73 *	154,61 ±5,78 *	149,47 ±5,62 #	133,41 ±4,12 #
СОД, усл. ед/(мин×мг белка)	48,29 ±3,18	45,34 ±2,14	46,24 ±4,12	57,47 ±3,42 #	68,34 ±6,01 *#
Каталаза, мкмоль/(мин×г белка)	491,11 ±21,62	532,32 ±38,21	542,18 ±28,24	620,13 ±24,40 *	640,73 ±20,42 *#
Глутатион- пероксидаза, ммоль/(мин×г белка)	5,86 ±0,21	5,54 ±0,18	5,21 ±0,23	6,14 ±0,35	9,07 ±0,54 *#
Примечание: * – различия по сравнению с интактной группой значимы ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с группой «НДМГ» значимы ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.					

Как видно из таблицы, наиболее выраженное влияние на состояние ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты гепатоцитов отмечено у отравленных крыс, получавших комбинацию пиридоксина гидрохлорида с ИГЦГДН, что подтверждается статистически значимым снижением концентрации продуктов окислительной деградации липидов по сравнению с группой «НДМГ» на 3-и и 7-е сутки, при этом данные показатели

практически не отличались от таковых в интактной группе. Кроме того, у животных, получавших комбинацию пиридоксина гидрохлорида с ИГЦГДН, наблюдалась наиболее выраженная активация ферментов антиоксидантной защиты: на 3-и сутки значимо по сравнению как с группой «НДМГ», так и с интактными животными, была повышена активность СОД, каталазы и глутатионпероксидазы. На 7-е сутки активность всех перечисленных выше ферментов у отравленных животных, получавших комбинацию пиридоксина гидрохлорида с ИГЦГДН, была достоверно выше показателей интактных животных и крыс группы «НДМГ».

Таким образом, по результатам проведённого исследования было установлено, что пиридоксина гидрохлорид как в монотерапии, так и в комбинации с ИГЦГДН, предотвращает развитие судорог и гибель у 100% отравленных крыс. Наилучший гепатозащитный эффект отмечен при комбинировании пиридоксина с ИГЦГДН, что подтверждается как снижением выраженности токсических сдвигов биохимических показателей крови, нормализацией состояния плазменно-коагуляционного гемостаза, так и отсутствием тяжёлых дегенеративных изменений в паренхиме печени. Кроме того, пиридоксина гидрохлорида и ИГЦГДН при совместном применении существенно снижали выраженность ПОЛ в клетках печени и приводили к активации ферментов антиоксидантной защиты.

Для уточнения широты действия препарата ИГЦГДН по временным и дозовым характеристикам во второй серии эксперимента были продолжены исследования по оценке фармакологической активности его комбинации с лечебным антидотом пиридоксина гидрохлоридом. ИГЦГДН при этом вводился по схеме II (внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг – за 2 часа до введения НДМГ, затем ежедневно, начиная со 2-го, и по 7-й день включительно).

Исследование выполнено на 69 беспородных белых крысах-самцах, которые были разделены на 4 группы: 1-я группа (n=9) – интактные животные; 2-я группа (n=24) – НДМГ (без фармакологической коррекции); 3-я группа (n=18) – НДМГ + ИГЦГДН (схема II); 4-я группа (n=18) – НДМГ + ИГЦГДН (схема II) + пиридоксин.

Полученные в результате исследования данные в целом были сходными с таковыми в первой серии экспериментов: наилучшая эффективность по исследуемым показателям была отмечена при комбинированном применении ИГЦГДН и пиридоксина гидрохлорида. При этом следует отметить, что ИГЦГДН при применении по схеме II без пиридоксина также способствовал статистически значимому снижению (в среднем на 39 %) летальности крыс по сравнению с группой «НДМГ» – погибло 2 животных из 18. Судорожный синдром наблюдался только у 56 ± 12 % (10 из 18) крыс, получавших ИГЦГДН по схеме II, что на 44 % меньше, чем у крыс без лечения и крыс, получавших ИГЦГДН в монотерапии по схеме I.

Морфометрическое исследование препаратов печени крыс показало, что ИГЦГДН при введении по схеме II в монотерапии статистически значимо снижал количество гепатоцитов с признаками белковой дегенерации (в среднем в 1,9 раза) и кариолизиса (в среднем в 1,4 раза) в гистологических срезах печени по сравнению с показателем у животных без лечения. Эффективность комбинации препаратов ИГЦГДН и пиридоксина гидрохлорида оказалась наиболее выраженной: количество в срезе печени гепатоцитов с признаками белковой дегенерации и кариолизиса было статистически значимо (в среднем в 1,4 раза) меньше, чем при изолированном применении ИГЦГДН, что свидетельствует о меньшей выраженности поражений печени у крыс, получавших лечение комбинацией препаратов (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние препаратов пиридоксина гидрохлорид и ИГЦГДН (схема II) на морфометрические показатели в гистологических препаратах печени крыс через 7 суток после однократного введения НДМГ в дозе ЛД₅₀, кл/мм² среза ($X \pm s_x$)

Показатель	Группа		
	НДМГ (n=6)	НДМГ + ИГЦГДН (схема II) (n=8)	НДМГ + ИГЦГДН (схема II) + пиридоксин (n=9)
Белковая дегенерация гепатоцитов	2432,8±56,78	1250,5±41,28 *	642,3±61,92 *#
Кариолизис	1421,2±47,64	1023,7±36,04 *	725,4±49,19 *#
Примечание: * – различия по сравнению с группой «НДМГ» значимы ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с группой «НДМГ+ИГЦГДН (схема II)» значимы ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.			

Таким образом, полученные по результатам двух серий экспериментов данные могут служить подтверждением антиоксидантной активности ИГЦГДН – повышая активность ферментов каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, препарат снижает выраженность процессов ПОЛ в клетках печени, чем, по-видимому, и обусловлена его гепатозащитная активность при остром отравлении НДМГ.

На третьем этапе работы проводили сравнительную оценку эффективности инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и глутамил-цистеинил-глицина динатрия при поражениях печени противотуберкулёзными препаратами (изониазид в комбинации с рифампицином и пиперазином). Поскольку ИГЦГДН является комбинированным препаратом, состоящим из пептидного и нуклеотидного компонентов, для уточнения роли каждого из этих компонентов было принято решение сравнить гепатозащитную эффективность препарата ИГЦГДН с однокомпонентным препаратом ГЦГДН.

Исследование проведено на 90 белых беспородных крысах-самцах. Противотуберкулёзные препараты (ПП) вводили животным по схеме, описанной ранее. ГЦГДН (20 и 40 мг/кг) и ИГЦГДН (30 мг/кг) вводили ежедневно в течение 14 дней внутрибрюшинно за 2 часа до введения противотуберкулёзных препаратов. Животные были разделены на 5 групп по 18 особей в каждой: 1-я группа – интактные животные, 2-я группа – ПП, 3-я группа – ПП+ГЦГДН 20 мг/кг, 4-я группа – ПП+ГЦГДН 40 мг/кг, 5-я группа – ПП+ИГЦГДН 30 мг/кг.

На 15-й день эксперимента животных подвергали эвтаназии, забирали кровь, выполняли патологоанатомическое вскрытие и извлекали печень для определения печёночного коэффициента, проведения морфогистологических и биохимических (определение уровня пероксидации липидов – ПОЛ) исследований.

Использование ГЦГДН в качестве средства коррекции возникающих при применении противотуберкулёзных препаратов токсических поражений печени приводило к значительному снижению их выраженности. При этом лучший гепатопротекторный эффект отмечался при применении ГЦГДН в дозе 40 мг/кг. Так, положительное влияние препарата подтверждается статистически значимым снижением печёночного коэффициента по сравнению с группой «ПП» (с $3,75 \pm 0,07$ % в группе «ПП» до $3,31 \pm 0,06$ % в группе «ПП +

ГЦГДН 20 мг/кг» и $3,20 \pm 0,07$ % в группе «ПП + ГЦГДН 40 мг/кг»). Не менее эффективным оказалось по показателю печёночного коэффициента и действие препарата ИГЦГДН ($3,17 \pm 0,08$ %).

Морфогистологическое исследование препаратов печени крыс показало, что у животных, получавших вместе с противотуберкулёзными препаратами ГЦГДН в дозе 40 мг/кг, патологические изменения в паренхиме, по сравнению с группой «ПП», выражены существенно меньше: структура ткани печени и балочное строение было сохранено во всех образцах, наблюдались лишь фокальные дистрофические изменения гепатоцитов, преимущественно в централобулярных отделах. При лечении ГЦГДН в дозе 20 мг/кг отмечалась тенденция к нормализации структуры печени, однако эффект был менее выраженным, чем при использовании большей дозы препарата.

ИГЦГДН, применённый в дозе 30 мг/кг, оказался для коррекции нарушений со стороны печени при интоксикации противотуберкулёзными препаратами более эффективным по сравнению с ГЦГДН.

Морфогистологическое исследование срезов печени крыс, получавших ИГЦГДН, свидетельствовало о наличии выраженной тенденции к нормализации структуры печёночной ткани. Во всех микропрепаратах была сохранена структура ткани печени и балочное строение паренхимы, визуально отмечались лишь незначительные изменения мелких групп гепатоцитов в виде базофильной зернистости цитоплазмы, встречающиеся преимущественно в централобулярных отделах печёночных долек, в перипортальных отделах некрвоспалительных изменений не отмечалось (рисунок 4).

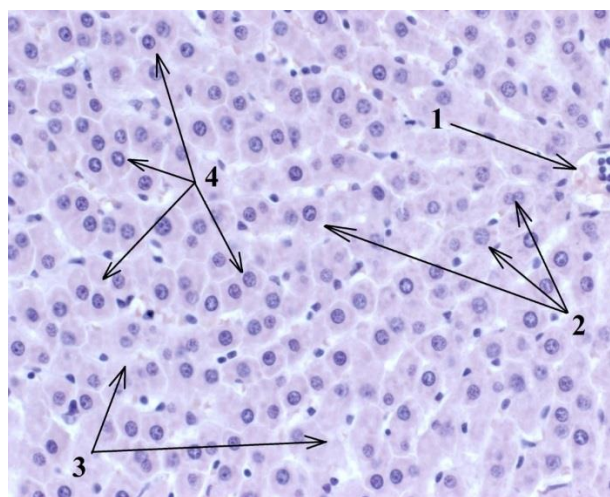


Рисунок 4 – Печень крысы после ежедневного введения ПП и лечения ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг, 15-й день эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$

1 – центральная вена; 2 – печёночные балки; 3 – очаговые дегенеративные изменения гепатоцитов; 4 – неизменённые гепатоциты.

Результаты морфометрического исследования гистологических препаратов печени крыс после двухнедельного введения противотуберкулёзных препаратов подтверждали наименьшую выраженность патологических изменений в изучаемом органе животных, получавших лечение ИГЦГДН (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние препаратов ГЦГДН и ИГЦГДН на морфометрические показатели в гистологических препаратах печени крыс, получавших комплекс противотуберкулёзных препаратов, 15-й день эксперимента, ($X \pm s_x$), кл/мм² среза ($X \pm s_x$)

Показатель	Группа			
	ПП	ПП+ГЦГДН 20 мг/кг	ПП+ГЦГДН 40 мг/кг	ПП+ИГЦГДН 30 мг/кг
Белковая дегенерация гепатоцитов	671,8±25,54	552,2±18,97 *	529,7±23,54 *	363,2±27,78 *#^
Кариолизис	836,1±37,43	669,0±27,11 *	539,4±19,01 *#	528,9±17,98 *#
Примечание: * – различия по сравнению с группой «ПП» значимы ($p < 0,05$); # – различия по сравнению с группой «ПП+ГЦГДН 20 мг/кг» значимы ($p < 0,05$); ^ – различия по сравнению с группой «ПП+ГЦГДН 40 мг/кг» значимы ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.				

При исследовании биохимических показателей крови установлено, что введение ГЦГДН в дозе 40 мг/кг приводило к статистически значимому снижению (с $12,52 \pm 1,56$ мкмоль/л в группе «ПП» до $7,25 \pm 0,53$ мкмоль/л в группе «ПП+ГЦГДН 40 мг/кг») концентрации общего билирубина в сыворотке крови животных, получавших препарат, по сравнению с группой «ПП». При применении ГЦГДН в дозе 20 мг/кг концентрация общего билирубина в сыворотке крови крыс составила $10,98 \pm 0,56$ мкмоль/л, что статистически не отличалось от показателя в группе «ПП». Концентрация общего билирубина в сыворотке крови животных, получавших ИГЦГДН, была в среднем в 4 раза ниже по сравнению с крысами в группе «ПП» и составила $3,07 \pm 0,60$ мкмоль/л. При этом данный показатель также значимо отличался от такового в группах, получавших ГЦГДН.

Активность ПОЛ оценивали по количеству ДК и МДА в гомогенатах печени. Установлено, что препарат ГЦГДН при использовании в дозировках 20 и 40 мг/кг статистически значимо снижал концентрацию ДК и МДА по сравнению с животными группы «ПП». При этом концентрация МДА в печени крыс, получавших ГЦГДН в дозе 20 мг/кг была значимо выше показателя интактной группы, группы, получавшей препарат в дозе 40 мг/кг, и группы, получавшей ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг.

ИГЦГДН при применении в дозе 30 мг/кг для коррекции нарушений со стороны печени при интоксикации противотуберкулёзными препаратами был ещё более эффективным по сравнению с ГЦГДН: введение ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг сопровождалось достоверным снижением концентрации ДК и МДА по сравнению с нелечеными животными. Содержание ДК в печени крыс, получавших ИГЦГДН, было в 1,55 раза ниже, чем у крыс без лечения. Концентрация МДА в гомогенатах печени при применении ИГЦГДН была статистически значимо ниже не только показателя в группе «ПП», но и в группе, получавшей ГЦГДН в дозе 20 мг/кг.

Таким образом, использование ГЦГДН и ИГЦГДН в качестве гепатопротекторов при поражениях печени противотуберкулёзными препаратами оказалось эффективным. Уровень гепатозащитной активности ГЦГДН носил дозозависимый характер. Наименее выраженные патологические изменения в печени наблюдались у животных, получавших ИГЦГДН в дозе 30 мг/кг. Это связано, по-видимому, с тем, что и ГЦГДН, и ИГЦГДН, являясь дисульфидами глутатиона, обладают опосредованной антиоксидантной активностью, при этом присутствие в составе ИГЦГДН инозина позволяет препарату более эффективно устранять поражения

печени за счёт улучшения микроциркуляции в паренхиме органа, восстановлению активности аэробных процессов в гепатоцитах и улучшению их энергообеспечения.

ВЫВОДЫ

1. Несимметричный диметилгидразин при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 115 мг/кг (ЛД₅₀) на 7-е сутки вызывал токсические поражения печени, что проявлялось в повышении на 67% активности щелочной фосфатазы, на 34% аспаратаминотрансферазы, в 2,4 раза содержания общего билирубина в сыворотке крови по сравнению с животными интактной группы, а также изменениях в системе глутатиона (снижении концентрации восстановленного глутатиона на 18%) и повышении показателей интенсивности перекисного окисления липидов (малонового диальдегида – на 24,9%) в печени.

2. На 7-е сутки после однократного внутрибрюшинного введения несимметричного диметилгидразина в дозе 115 мг/кг (ЛД₅₀) у крыс отмечались морфологические изменения в паренхиме печени, состоящие в дисконформации печёночных балок, дегенеративных изменениях гепатоцитов в виде зернистости, неравномерного просветления цитоплазмы и кариолизиса. В гистологических препаратах печени на 1 мм² среза наблюдалось в среднем 2500 гепатоцитов с признаками белковой дегенерации и 1400 с признаками кариолизиса.

3. Инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия в дозе 30 мг/кг в монотерапии при внутрибрюшинном введении за 2 часа до отравления НДМГ в дозе ЛД₅₀ снижал летальность крыс на 39 %, а развитие судорог у отравленных животных на 44 %.

4. При совместном применении инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия с пиридоксина гидрохлоридом пептидный препарат не снижал эффективность антидота.

5. При остром отравлении несимметричным диметилгидразином в дозе ЛД₅₀ совместное применение пиридоксина гидрохлорида в дозе 50 мг/кг (однократно через 30 минут после отравления) и инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия в дозе 30 мг/кг по 2-м схемам (за 2 часа до или через 30 минут после отравления, затем – ежедневно в течение 6 суток) приводило к уменьшению выраженности признаков токсического поражения печени: значимому снижению, по сравнению с нелечеными животными, активности АСТ, щелочной фосфатазы и концентрации общего билирубина в сыворотке крови, снижению концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, а также повышению активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в гомогенатах печени.

6. При остром отравлении НДМГ в среднесмертельной дозе совместное применение пиридоксина гидрохлорида в дозе 50 мг/кг и инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия в дозе 30 мг/кг по схемам сопровождалось уменьшением выраженности морфологических изменений в печени отравленных крыс (сохранялось балочное строение и отсутствовали тяжёлые дегенеративные изменения в паренхиме). В гистологических препаратах печени крыс, получавших лечение комбинацией препаратов, количество гепатоцитов с признаками белковой дегенерации в среднем было более чем в 3,5 раза меньше, чем у нелеченых животных, количество гепатоцитов с признаками кариолизиса – в 2 раза меньше.

7. Инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия при ежедневном внутрибрюшинном введении в дозе 30 мг/кг за 2 часа до введения противотуберкулёзных

препаратов (изониазид – 50 мг/кг внутривенно, рифампицин в дозе 250 мг/кг и пиразинамид в дозе 45 мг/кг – внутривенно) уменьшал выраженность токсических поражений печени. При этом снижались более чем в 4 раза концентрация общего билирубина в сыворотке крови; на 26% концентрация диеновых конъюгатов и на 44% концентрация малонового диальдегида в гомогенатах печени по сравнению с нелечеными животными. В гистологических препаратах печени наблюдалось уменьшение количества гепатоцитов с признаками белковой дегенерации в среднем в 1,9 раза, гепатоцитов с признаками кариолизиса – в 1,6 раза по сравнению с нелечеными животными.

8. По данным биохимических показателей крови и результатам морфогистологического исследования печени эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия в дозе 30 мг/кг/сут была выше, чем препарата глутамил-цистеинил-глицина динатрия (в дозах 20 и 40 мг/кг/сут) при токсических поражениях печени, вызванных противотуберкулёзными препаратами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Анализ полученных экспериментальных данных о гепатозащитной активности комбинации ИГЦГДН с пиридоксина гидрохлоридом при остром крайне тяжёлом отравлении несимметричным диметилгидразином позволяет рекомендовать дальнейшее изучение препарата ИГЦГДН в качестве средства лечения токсических поражений печени.

2. Выявленная в эксперименте более высокая эффективность ИГЦГДН по сравнению с ГЦГДН при поражениях печени, вызванных комбинацией противотуберкулёзных препаратов (изониазид, рифампицин и пиразинамид), позволяет рекомендовать проведение дальнейших доклинических и клинических исследований возможности использования ИГЦГДН как гепатозащитного средства при лечении больных туберкулёзом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бугаев, П.А. Изучение эффективности препаратов моликсан и гептрал при остром отравлении солянокислым гидразином / П.А. Бугаев // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 16–17.

2. Бугаев, П.А. Эффективность моликсана при интоксикации, вызванной длительным употреблением изониазида, в эксперименте на лабораторных животных / П.А. Бугаев // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 17–18.

3. Бугаев, П.А. Изучение эффективности препаратов моликсан, гептрал и пиридоксин при остром отравлении несимметричным диметилгидразином (НДМГ) / П.А. Бугаев, Д.В. Лёзов, Я.В. Завирский, Ю.И. Косенко // Материалы XX Международной медико-биологической научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», СПбГУ, 22 апреля 2017 г. – 2017. – Т. XX. – С. 95–96.

4. Бугаев, П.А. Острое отравление солянокислым гидразином в эксперименте: клиническая картина, расчёт ЛД₅₀ / П.А. Бугаев, В.Л. Рейнюк, А.Е. Антушевич // Известия Российской военно-медицинской академии (Материалы Первой всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века», ВМедА им. С.М. Кирова, Санкт-

Петербург, 17-19 мая 2017 г.). – 2017. – Т. XXXVI, № 2, Прил. 1. – С. 37-38.

5. Бугаев, П.А. Гидразин и его производные: токсикологическая характеристика / П.А. Бугаев, А.Е. Антушевич, В.Л. Рейнюк, В.А. Башарин // *Современные проблемы науки и образования*. – 2017. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26611>

6. Антушевич, А.Е. Эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и пиридоксина гидрохлорида при остром отравлении несимметричным диметилгидразином / А.Е. Антушевич, В.А. Башарин, В.Л. Рейнюк, П.А. Бугаев // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. – 2018. – № 1(61). – С. 164–167.

7. Бугаев, П.А. Эффективность профилактического применения моликсана в монотерапии и в комбинации с пиридоксином при остром отравлении 1,1-диметилгидразином / П.А. Бугаев, Ю.В. Павленок, А.В. Дмитриев, П.А. Долгих // *Материалы Всероссийского научного форума студентов и молодых учёных «Студенческая наука – 2018»*. – СПб., 2018. – С. 674–675.

8. Башарин, В.А. Эффективность комбинации моликсана с пиридоксина гидрохлоридом при остром отравлении 1,1-диметилгидразином / В.А. Башарин, А.Е. Антушевич, В.Л. Рейнюк, П.А. Бугаев // *Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы V съезда фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств»*, Ярославль, 14-18 мая 2018 г. – М.: Фолиум, 2018. – С. 26–27.

9. Орлов, Ю.В. Эффективность дисульфидов глутатиона в лечении токсических гепатитов и циррозов печени / Ю.В. Орлов, П.А. Бугаев, Ю.Ш. Халимов, В.А. Башарин, Д.А. Синячкин, А.Е. Антушевич // *Военно-медицинский журнал*. – 2018. – Том СССXXXIX, № 11. – С. 21–27.

10. Бугаев, П.А. Сравнительная эффективность моликсана и глютоксима на модели токсического поражения печени противотуберкулёзными препаратами / П.А. Бугаев, В.А. Башарин, А.Е. Антушевич // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2019. – Т. 17, № 2. – С. 49–54.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	—	аланинаминотрансфераза
АСТ	—	аспартатаминотрансфераза
ВГ	—	восстановленный глутатион
ГГТП	—	гамма-глутамилтранспептидаза
ГП	—	глутатионпероксидаза
ГР	—	глутатионредуктаза
ГЦГДН	—	глутамил-цистеинил-глицин динатрия
Г-6-Ф-ДГ	—	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ДК	—	диеновые конъюгаты
ИГЦГДН	—	инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия
ЛД ₅₀	—	среднесмертельная доза
МДА	—	малоновый диальдегид
МНО	—	международное нормализованное отношение
НДМГ	—	несимметричный диметилгидразин

НИР	—	научно-исследовательская работа
ПО	—	протромбиновое отношение
ПОЛ	—	перекисное окисление липидов
ПП	—	противотуберкулёзные препараты
ПТИ	—	протромбиновый индекс
РАН	—	Российская академия наук
СГ	—	сульфгидрильные группы
СОД	—	супероксиддисмутаза
ТВ	—	тромбиновое время
ЩФ	—	щелочная фосфатаза