

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕХАНИЗМА СНИЖЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ИЗОНИАЗИДА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ТУБЕРКУЛОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Саджая Л.А.¹, Сергеева Е.О.¹, Юртаева Е.А.¹, Абисалова И.Л.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, e-mail: maklea@yandex.ru

Целью исследования являлась коррекция влияния предложенных гранул изониазида с пектином на антиоксидантную систему гепатоцитов для нормализации интенсивности перекисного окисления липидов и снижения токсичности изониазида на фоне проверки туберкулостатической активности. Антиоксидантную активность гранул изониазида с пектином свековичным определяли на белых беспородных крысах массой 180-200 г по содержанию ТБК-активных продуктов в печени и крови, диеновых конъюгатов в печени. Сравнительная оценка туберкулостатической активности изониазида и его лекарственной формы - гранул изониазида с пектином - проводилась бактериологическим методом с использованием выделенной чистой культуры туберкулеза H37Rv. Полученные данные, показавшие усиление клеточных резервов антиоксидантной защиты и отсутствие роста микобактерий туберкулеза, свидетельствуют о сохранении в печени индуцированного антиоксидантного равновесия и бактериостатического действия гранул изониазида с пектином. Минимальная, подавляющая рост микобактерий туберкулеза, концентрация при непрямом методе составила 0,2 мкг/мл. Это говорит о том, что лекарственная форма - гранулы изониазида с пектином - не уступает по туберкулостатической активности препарату изониазиду. Гранулы изониазида с пектином обладают менее повреждающим воздействием на гепатоциты с сохранением защитных антиоксидантных механизмов. Минимальные бактерицидные концентрации и минимальные подавляющие концентрации изученных субстанций, и в целом их эффективность в отношении всех использованных в эксперименте тест-культур, не отличались друг от друга.

Ключевые слова: изониазид, гранулы, туберкулостатическая активность, противотуберкулезные средства.

SOME ASPECTS OF THE PATHOGENETIC MECHANISM OF REDUCING THE TOXICITY OF ISONIAZID IN THE STUDY OF TUBERCULOSTATIC ACTIVITY

Sajaya L.A.¹, Sergeeva E.O.¹, Yurtaeva E.A.¹, Abisalova I.L.¹

¹Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – a branch of the Federal State Educational Institution of Higher Education “The Volgograd State Medical University of Public Health Ministry of the Russian Federation”, Pyatigorsk, e-mail: maklea@yandex.ru

Research objective: correction of the effect of the proposed isoniazid granules with pectin on the antioxidant system of hepatocytes to normalize the intensity of lipid peroxidation and reduce the toxicity of isoniazid against the background of testing tuberculostatic activity. The antioxidant activity of isoniazid granules with beet pectin was determined on white outbred rats weighing 180-200 g. by the content of TBA-active products in the liver and blood, diene conjugates in the liver. A comparative assessment of the tuberculostatic activity of isoniazid and its dosage form - isoniazid granules with pectin was carried out by a bacteriological method using an isolated pure culture of tuberculosis H37Rv. The data obtained, which showed an increase in cellular reserves of antioxidant protection and the absence of growth of Mycobacterium tuberculosis, indicate the preservation of the induced antioxidant balance in the liver and the bacteriostatic effect of isoniazid granules with pectin. The minimum concentration that suppresses the growth of Mycobacterium tuberculosis with the indirect method was 0.2 µg / ml. This suggests that the dosage form of isoniazid granules with pectin is not inferior in tuberculostatic activity to the drug isoniazid. Isoniazid granules with pectin have a less damaging effect on hepatocytes with the preservation of protective antioxidant mechanisms. The minimum bactericidal concentrations and minimum inhibitory concentrations of the studied substances and, in general, their effectiveness against all test cultures used in the experiment did not differ from each other.

Keywords: isoniazid, granules, tuberculostatic activity, antituberculosis drugs.

Введение. Туберкулез (ТБ) является серьезной глобальной проблемой здравоохранения. По данным ВОЗ, в год в мире регистрируется 9 миллионов новых случаев

туберкулеза, из них 2 миллиона - смертельные случаи [1, с. 9-10]. Появление штаммов микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью является еще одним вызовом человечеству. Наиболее распространенным лекарственным средством, применяемым против туберкулеза, является изониазид [2]. Этот метод лечения приводит ко многим метаболическим и морфологическим нарушениям в печени, поскольку печень является основным органом детоксикации для этого противотуберкулезного препарата. Применение изониазида в течение 9 месяцев вызывает серьезные побочные эффекты в организме, включая аллергические реакции, желудочно-кишечные расстройства, неврологические расстройства, головокружение, а наиболее серьезным из них является гепатит. Этот процесс характеризуется снижением концентрации сывороточного альбумина и повышением концентрации сывороточного глобулина [3]. Эти эффекты связаны с тяжестью и продолжительностью заболевания. Было показано, что перекисное окисление эндогенных липидов (ПОЛ) является основным фактором цитотоксического действия изониазида. Окислительное повреждение, опосредованное противотуберкулезными препаратами, обычно связывают с образованием высокореактивного кислорода, который действует как стимулятор ПОЛ и источник разрушения и повреждения клеточных мембран [4; 5]. В связи с вышеизложенным создание новых лекарственных форм изониазида с пролонгирующим действием на очаги туберкулезного возбудителя, снижающих тем самым его гепатотоксическое действие, представляется актуальным.

Для улучшения биофармацевтических свойств производных изоникотиновой кислоты предложено несколько путей.

Ряд авторов предлагает пролонгировать действие изониазида в лекарственных формах, создавая их на основе сополимеров. При этом срок нахождения изониазида в организме увеличивается в 1,0-2,0 раза [6, с. 464-465].

В Пятигорском медико-фармацевтическом институте группой ученых получены соединения — включения изониазида с циклодекстрином. Исследования противотуберкулезной активности показали, что активность изониазида в соединении - включении сохраняется. В то же время острая токсичность снижается в 1,4 раза [7]. Кроме циклодекстринов, в мировой практике для создания лекарственных форм препаратов используют и другие полисахариды.

Для улучшения биофармацевтических свойств изониазида авторами предложена его лекарственная форма на основе сочетания с полисахаридами — гранулы изониазида с пектином свекловичным и сахарозой в соотношении 1:6:1. Установлено, что гранулы изониазида с пектином характеризуются пониженной токсичностью, снижением элиминации, повышением биодоступности и пролонгированным действием [8].

Пектиновые вещества проявляют антимикробные свойства, не оказывают отрицательного действия на восстановление белкового состава крови. 1%-ный раствор пектина не обладает токсическим и антигенным свойством, он не кумулируется в органах и тканях и не вызывает патологических изменений [9, с. 160].

Цель исследования: оценка эффективности корректирующего действия гранул изониазида с пектином на антиоксидантную систему печени и сравнение их антимикобактериального действия с изониазидом в стандартной лекарственной форме.

Материалы и методы исследования

Антиоксидантную активность предложенной лекарственной формы гранул изониазида с пектином свекловичным определяли в эксперименте на белых беспородных крысах массой 180-200 г, находившихся в стандартных условиях вивария. Показателями оценки интенсивности ПОЛ служили методики определения ТБК-активных продуктов в гомогенате печени и крови и диеновые конъюгаты (ДК) в печени, выполненные по стандартным методикам.

Сравнительную оценку антимикобактериального действия изониазида и его лекарственной формы – гранул изониазида с пектином - проводили методом серийных разведений в среде МБТ-бульон с последующим пересевом на среду Левенштейна - Йенсена [10, с. 10-12]. В качестве тест-культур (10 штаммов) были использованы клинические изоляты *M. tuberculosis*, выделенные от больных, находящихся на стационарном лечении в ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный медицинский фтизиопульмонологический центр». Все культуры поддерживались на среде Левенштейна - Йенсена (ТУ 9385-021-39484474-2012; ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург, Россия); МБТ-бульон (ТУ 9385-26-14237183-2009; ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Махачкала).

Использованный в эксперименте метод серийных разведений заключался в создании ряда последовательных разведений исследуемых гранул изониазида с пектином и чистого изониазида, использованного в опыте в качестве контроля. В среде МБТ-бульон готовили ряд разведений: 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл. Пробирка, содержащая среду МБТ-бульон и культуру для оценки жизнеспособности микобактерий, и пробирка только со средой для оценки стерильности использованной среды (контроли).

Разведения лекарственной формы гранул изониазида с пектином готовили таким образом, чтобы концентрации изониазида в гранулах соответствовали концентрациям чистого изониазида. Навеску изониазида (6,4 мг) и гранул изониазида с пектином (44,8 мг) растворяли в 50 мл воды очищенной с несколькими каплями соляной кислоты 0,1 М до растворения. Получали рабочий раствор с концентрацией 128 мкг/мл, из которого готовили разведения согласно методике.

Все работы проводили в боксе с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности [11; 12].

Взвесь *M. tuberculosis* готовили из 4-недельных культур, выращенных на скошенной плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена. Снимали петлей колонию микобактерий, затем помещали в стеклянную пробирку, растирали стеклянной палочкой в течение 4-5 минут и добавляли стерильный физиологический раствор. Суспензию культуры стандартизировали по стандарту мутности McFarland 5, что соответствует $15 \cdot 10^8$ микробных тел в 1 мл. Затем в каждую пробирку, кроме пробирки с контролем чистоты среды, добавляли по 0,2 мл взвеси микроорганизмов. Посевы помещали в термостат при температуре 37 °С на 10-14 дней. По прошествии этого срока пробирки доставали и визуально оценивали наличие роста. В контрольной пробирке ожидался придонный рост с диффузным помутнением бульона. Минимальной подавляющей концентрацией (МПК) считали ту пробирку в ряду, в которой визуально не наблюдалось роста культуры. После этого пробирки центрифугировали (1500 об. мин./10 мин.), удаляли надосадочную жидкость, отмывали стерильным физиологическим раствором осадок и высевали на среду Левенштейна - Йенсена по 0,05 мл в каждую пробирку. Посевы инкубировали 10 дней при температуре 37 °С, после чего оценивали наличие и интенсивность роста колоний. Концентрация в ряду разведений, в которой не обнаруживалось роста, считалась минимальной бактерицидной концентрацией (МБК), а минимальной подавляющей концентрацией (МПК) - та, при которой наблюдалось задержка роста на 50% относительно контроля. Каждый высеv осуществляли не менее чем в шести повторностях. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы BioStat-2009 (Analist Soft Ins., США).

Результаты исследования и их обсуждение

Ранее проведенными исследованиями применения изониазида в сравнении с лекарственной формой гранул изониазида с пектином было установлено, что применение изониазида в дозе 200 мг/кг сопровождается повышением АлАТ, ЩФ, общего холестерина в крови при одновременном снижении содержания гликогена и общих липидов в печени. При применении лекарственной формы изониазида с пектином в эквивалентной дозе показатели нормализовались.

При сравнительном введении изониазида и его лекарственной формы гранул изониазида с пектином группам крыс было показано, что у крыс, получавших изониазид в дозе 200 мг/кг, наблюдалось снижение ТБК-активных продуктов и ДК в печени на 68% и 50% соответственно, а содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке повысилось на 104%. У крыс, получавших гранулы изониазида с пектином, наблюдалось незначительное снижение ТБК-активных продуктов и ДК в печени - на 27% и 32% соответственно по сравнению с

нормой, а содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке понизилось на 40% по отношению к контрольной группе животных. Данные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние введения изониазида и комбинации изониазид+пектин на продукты ПОЛ

Показатели	Группы животных		
	Интактные (контроль)	Изониазид, 200 мг/кг	Изониазид с пектином и сахарозой в соотношении (1:6:1)
ТБК-активные продукты сыв. крови, мкмоль/л	1,24± 0,085	2,53±0,611 Р _и <0,01 +104%	1,51±0,342 Р _и >0,5 +22% Р _к <0,01 -40%
ТБК-активные продукты печени, нмоль/мг белка	0,19±0,035	0,06±0,013 Р _и <0,01 -68%	0,15±0,014 Р _и >0,5 -27% Р _к <0,01 +150%
ДК печени, нмоль/мг белка	3,13 ±0,341	1,55±0,331 Р _и <0,01 -50%	2,12±0,232 Р _и >0,5 -32% Р _к <0,01 +37%

Примечание: Р_и – достоверно по отношению к интактным (контрольным) животным; Р_к – достоверно по отношению к животным, получавшим изониазид.

Визуальная оценка роста микобактерий на среде МБТ-бульон под действием изониазида показала, что исследуемое соединение активно подавляло рост микобактерий. Для штаммов 1, 4, 10 минимальная бактерицидная концентрация (МБК) была определена в концентрациях 128-64 мкг/мл, для остальных штаммов - в диапазоне концентраций 128-32 мкг/мл. Под действием этих концентраций помутнение и придонный рост отсутствовали полностью. При снижении концентрации изониазида в пробирках появлялся сначала слабый (16-4 мкг/мл), затем интенсивный рост (2-1 мкг/мл), сопоставимый с контролем. Визуальная оценка активности в отношении микобактерий туберкулеза гранул изониазида с пектином в целом не отличалась от действия свободного изониазида. Только в некоторых случаях, для штаммов 1 и 8, наблюдался достаточно интенсивный рост при концентрации 16 мкг/мл, что в целом не искажает данные, а, по-видимому, является особенностью этих штаммов (табл. 2, 3).

Таблица 2

Визуальная оценка активности изониазида
в отношении *M. tuberculosis* на среде МБТ-бульон

Штамм, №	Концентрация изониазида, мкг/мл							
	128	64	32	16	8	4	2	1
1	-	-	+	+	++	++	+++	+++
2	-	-	-	-	+	++	+++	+++
3	-	-	-	+	+	++	+++	+++

4	-	-	-	+	++	++	+++	+++
5	-	-	-	+	+	++	+++	+++
6	-	-	-	-	+	++	+++	+++
7	-	-	-	-	+	++	+++	+++
8	-	-	-	+	+	++	+++	+++
9	-	-	-	+	+	++	+++	+++
10	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Контроль роста	+++							

Примечание: «-» - полная прозрачность среды; «+» - слабый рост; «++» - умеренный рост; «+++» - интенсивный рост.

Таблица 3

Визуальная оценка активности гранул изониазида с пектином
в отношении *M. tuberculosis* на среде МБТ-бульон

Штамм, №	Концентрация гранул изониазида с пектином, мкг/мл							
	128	64	32	16	8	4	2	1
1	-	-	+	++	++	++	+++	+++
2	-	-	-	-	+	++	+++	+++
3	-	-	-	+	+	++	+++	+++
4	-	-	-	+	++	++	+++	+++
5	-	-	-	+	+	++	+++	+++
6	-	-	-	-	+	++	+++	+++
7	-	-	-	+	+	++	+++	+++
8	-	-	-	++	+	++	+++	+++
9	-	-	-	+	+	++	+++	+++
10	-	-	+	+	++	++	+++	+++
Контроль роста	+++							

Примечание: «-» - полная прозрачность среды; «+» - слабый рост; «++» - умеренный рост; «+++» - интенсивный рост.

Далее была проведена оценка наличия и интенсивности роста *M. tuberculosis* на среде Левенштейна - Йенсена. Результаты, приведенные в таблицах 4 и 5, наглядно демонстрируют, что как изониазид, так и гранулы изониазида с пектином оказывают идентичное противотуберкулезное действие. Минимальная бактерицидная концентрация изучаемых субстанций находилась в диапазоне 128-32 мкг/мл для всех тест-культур. Штаммы 1 и 10 демонстрировали незначительный рост атипичных колоний при применении концентрации 32 мкг/мл, что, по-видимому, связано с их устойчивостью к изониазиду в целом. Как было отмечено ранее, МПК считалась та, при которой отмечалась задержка роста на 50% и более относительно контроля. Минимальной подавляющей концентрацией в эксперименте можно

считать диапазон концентраций от 16 до 4 мкг/мл. Снижение концентрации субстанций приводило к появлению многочисленных атипичных, а в некоторых случаях (при концентрации 1 мкг/мл) типичных колоний микобактерий туберкулеза.

Таблица 4

Оценка активности изониазида в отношении *M. tuberculosis* на среде Левенштейна - Йенсена

Штамм, №	Концентрация изониазида, мкг/мл							
	128	64	32	16	8	4	2	1
1	-	-	2,3±0,42	2,3±0,5	6,2±0,5	18,7±1,18	20,8±0,65	29,3±1,15
2	-	-	-	-	5,7±0,61	15,2±0,47	26,2±0,94	30,3±0,56
3	-	-	-	2,5±0,34	3,0±0,37	15,3±0,49	24,2±0,65	31,3±0,33
4	-	-	-	3,8±0,40	13,3±0,61	26,5±0,5	26,5±0,84	30,3±0,42
5	-	-	-	2,3±0,21	4,5±0,22	12,5±0,34	18,0±0,26	28,0±0,26
6	-	-	-	-	4,2±0,31	10,2±0,40	24,2±0,31	29,7±0,33
7	-	-	-	-	2,5±0,34	9,0±0,26	14,5±0,34	29,3±0,42
8	-	-	-	2,5±0,34	4,7±0,49	14,3±0,49	24,7±0,33	27,7±0,33
9	-	-	-	2,0±0,26	3,5±0,22	9,5±0,34	14,0±0,26	27,5±0,22
10	-	-	1,3±0,21	2,5±0,34	7,3±0,21	12,5±0,34	30,0±0,26	30,8±0,31
Контроль роста	31,7±2,6							

Таблица 5

Оценка активности гранул изониазида с пектином в отношении *M. tuberculosis* на среде Левенштейна - Йенсена

Штамм, №	Концентрация гранул изониазида с пектином мкг/мл							
	128	64	32	16	8	4	2	1
1	-	-	2,0±0,26	6,0±0,26	12,0±0,52	14,0±0,26	26,2±0,40	29,3±0,21
2	-	-	-	-	1,5±0,22	4,7±0,21	19,5±0,43	29,3±0,33
3	-	-	-	1,5±0,34	2,2±0,31	8,7±0,21	23,2±1,35	29,7±0,33
4	-	-	-	4,8±0,16	10,5±0,34	10,8±0,40	25,2±0,40	29,7±0,21
5	-	-	-	2,0±0,26	4,0±0,26	11,5±0,34	19,0±0,26	29,3±0,34
6	-	-	-	-	4,7±0,21	9,0±0,25	26,0±0,26	29,3±0,33
7	-	-	-	2,5±0,34	8,7±0,21	14,0±0,26	27,3±0,21	30,3±0,21
8	-	-	-	3,0±0,26	5,0±0,26	15,7±0,21	27,3±0,21	29,3±0,33
9	-	-	-	2,5±0,34	5,0±0,26	10,5±0,34	16,7±0,21	30,0±0,52
10	-	-	2,0±0,26	3,7±0,34	7,2±0,40	15,8±0,75	28,0±0,73	31,0±0,63
Контроль роста	31,7±2,6							

Закключение. Таким образом, исходя из данных при сравнительном изучении применения изониазида и его лекарственной формы в виде гранул с пектином, можно сделать вывод, что гранулы изониазида с пектином обладают менее повреждающим воздействием на гепатоциты с сохранением защитных антиоксидантных механизмов.

На основании полученных результатов сравнительных исследований стандартной лекарственной формы изониазида и гранул изониазида с пектином можно заключить, что минимальные бактерицидные концентрации и минимальные подавляющие концентрации

изученных субстанций, и в целом их эффективность в отношении всех использованных в эксперименте тест-культур, не отличались друг от друга.

Список литературы

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization. 2023. P. 57. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.– [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023/> (дата обращения: 25.10.2024).
2. Клинические рекомендации. Туберкулез у взрослых. Кодирование по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем: A15-A19 Утверждены Минздравом России, 23.04.2024. 166 с.
3. John P., Kale P.P. Prominence of Oxidative Stress in the Management of Anti-tuberculosis Drugs Related Hepatotoxicity // Drug. Metab. Lett. 2019. Vol. 13(2). P. 95-101. DOI: 10.2174/1872312813666190716155930.
4. Zhuang X., Li L., Liu T., Zhang R., Yang P., Wang X., Dai L. Mechanisms of isoniazid and rifampicin-induced liver injury and the effects of natural medicinal ingredients: A review// Front Pharmacol. 2022. Vol. 13. P. 1-18. DOI: 10.3389/fphar.2022.1037814.
5. Combrink M., Loots D.T., du Preez I. Metabolomics describes previously unknown toxicity mechanisms of isoniazid and rifampicin// Toxicol. Lett. 2020. no. 4. P. 104-110. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.01.018.
6. Ле-Дейген И.М., Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Системы доставки фторхинолонов: новые перспективы в борьбе с туберкулезом // Биоорганическая химия. 2017. Т. 43. №5. С. 464-480.
7. Компанцева Е. В., Овчаренко Л. П., Халата А. В., Кулешова С. А. Фармакокинетическая и общетоксическая оценка гранул изониазида и пиридоксина гидрохлорида // Экология человека. 2007. №2. С.7-10.
8. Кайшева Н.Ш. Получение и изучение физико-химических и гепапротекторных свойств пектиновых веществ // Химико-фармацевтический журнал. 1997. № 6. С. 28-29.
9. Риянова Э.Э., Кострюкова Н.В. Получение пектина из свекловичного жома // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. №4 (58). Ч.1. С.160-163.
10. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. М., Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2014. 72 с.

11. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 N 4 (ред. от 25.05.2022) "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (вместе с "СанПиН 3.3686-21. Санитарные правила и нормы...") (Зарегистрировано в Минюсте России 15.02.2021 N 62500) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.consultant.ru/> (дата обращения: 25.10.2024).
12. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 2021. 870 с.