

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МАСЛА СЕМЯН АМАРАНТА ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ, ВЫЗВАННЫХ ИЗОНИАЗИДОМ

Е. Н. Музалевская¹, В. А. Николаевский¹, Ю. Н. Чернов²

¹ Воронежский государственный университет

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Поступила в редакцию 20.05.2015 г.

Аннотация. В экспериментальном исследовании показана целесообразность применения прессового масла семян амаранта для профилактики нейро-, кардио- и гепатотоксических реакций, индуцированных изониазидом.

Ключевые слова: изониазид, интоксикация, гепатотоксичность, кардиотоксичность, нейротоксичность, масло семян амаранта.

Abstract. In an experimental research the expediency of the amaranth seeds press oil application for the prevention of the neuro-, cardio- and hepatotoxic responses induced by isoniazid is shown.

Key words: isoniazid, intoxication, hepatotoxicity, cardiotoxicity, neurotoxicity, amaranth seed oil.

Начиная с 1952 года и до настоящего времени изониазид остается одним из основных препаратов в схемах лечения больных туберкулезом [1]. Вместе с тем, курс лечения изониазидом длителен, что сопряжено с его малой молекулярной массой и быстрой элиминацией из организма, а также с необходимостью ежедневного приема для постоянного поддержания терапевтической концентрации в крови. Все это приводит к необходимости применять большие дозы изониазида, что сопровождается повышенным риском развития побочных реакций. Наиболее характерными осложнениями, обусловленными как самим препаратом, так и продуктами его метаболизма, являются нейро-, кардио- и гепатотоксические реакции [2]. В связи с чем, целью данной работы являлось экспериментальное обоснование возможности применения прессового масла семян амаранта, обладающего широким спектром фармакологической активности [3] для профилактики осложнений, индуцированных изониазидом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 135 белых аутбредных крысах-самцах с массой тела 208.3 ± 11.1 г (питомник Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко). Животные в исследуемых группах были подобраны по принципу парных аналогов по полу, возрасту и массе тела, расчет доз проводили индивидуально для каждого животного.

Для создания модели острой интоксикации крысам в желудок вводили изониазид (субстанция производства Alfa Aesar, United Kingdom) в виде 1% крахмальной слизи в дозе 542 мг/кг массы тела один раз в сутки в течение 6 суток в утренние часы до основного кормления. Данная схема и дозы изониазида сопровождаются развитием тяжелого токсического повреждения печени [4].

С целью профилактики токсического повреждения печени, вызванного изониазидом, использовали прессовое масло семян амаранта, обладающее доказанной гепатопротекторной активностью [5]. В качестве препарата сравнения был выбран эталонный гепатопротектор, содержащий эссенциальные фосфолипиды соевых бобов (ЭФЛ) –

препарат Эссенциале Н (Санофи-Авентис С.А., Испания).

Животные были разделены на 4 группы. Первая группа (n=6) – интактные животные, которым внутривенно вводили 0.9% раствор натрия хлорида из расчета 0,5 мл/кг один раз в сутки в течение 6 суток. Вторая группа (n=43) – животные с моделью интоксикации (контроль). Крысам 3-й группы (n=43) в течение 6 суток в желудок за 1 час до введения изониазида вводили эссенциальные фосфолипиды соевых бобов (Эссенциале Н) в виде официального раствора в дозе 80 мг/г (опытная группа) [6]. Животным 4-й группы (опытная группа, n=43) в течение 6 суток в желудок за 1 час до введения изониазида вводили масло семян амаранта в дозе 600 мг/кг (содержание фосфолипидов 50 мг/кг).

Введение исследуемых веществ в желудок осуществляли с помощью металлического атравматичного зонда.

Через 1 час и 24 часа после однократного введения изониазида, а также на 3, 7, 10 и 14 сутки проводили оценку психоэмоционального состояния животных, функциональной активности сердца (по данным электрокардиограммы), свертываемости крови (протромбиновое время), биохимические и гистохимические исследования.

Психоэмоциональное состояние животных оценивали путем построения эвристической модели поиска животными решения задачи по спасению из эмоционально-физической экстремальной ситуации [7]. Моделирование стрессовой ситуации достигали помещением животных в цилиндр с холодной водой $T=11^{\circ}\text{C}$. Определяли время нахождения решения и время выполнения задачи покинуть цилиндр при помощи предлагаемых средств спасения (рейки и веревки). Согласно методике рассчитывали: процентную вероятность решения задачи (ВРЗ), Индекс психоэмоционального (ИПД) и моторно-двигательного (ИДД) воздействия.

Запись электрокардиограмм животных проводили при усилении 20 mv и скорости движения ленты 50 мм/сек во втором стандартном отведении на электрокардиографе ЭК1Т-04 АКЦИОН (Россия).

Забор крови для биохимических исследований проводили под наркозом из бедренной артерии животных. В сыворотке крови определяли активность (Е/л) аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) на биохимическом анализаторе Fuguno 270 кинетическим

методом с использованием диагностических наборов «Fluitest GPT»; концентрацию общего билирубина (мкмоль/л) фотометрическим методом с использованием диагностических наборов «ДиаС», концентрацию общего холестерина (ммоль/л).

Об активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по количеству в сыворотке крови вторичных продуктов липопероксидации, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты) [8].

Определение протромбинового времени осуществляли с использованием диагностического набора «Диатем-П».

Для гистохимических исследований фрагменты печени фиксировали в 10% растворе формалина с добавлением кальция хлорида, после чего по общепринятой методике на замораживающем микротоме готовили серийные срезы толщиной 3-4 мкм. Окраску препаратов для выявления липидов проводили красителем Oil Red O [9].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью статистических программ, используемых в биологии и медицине с определением достоверности с использованием t-критерия Стьюдента (различия считали достоверными при уровне $p<0.05$; $p<0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в контрольной группе животных однократное введение изониазида в дозе 542 мг/кг сопровождалось развитием клоникотонических судорог в 100% случаев и гибелью 33% особей. У выживших крыс, подвергнутых дальнейшему моделированию интоксикации изониазидом, начиная с 1-х суток исследования наблюдались: гиподинамия, заторможенность, снижение потребления корма, на электрокардиограмме – уменьшение длительности интервала QT ($p<0.05$). Наиболее выраженные изменения психоэмоционального состояния животных наблюдались на 7 сутки исследования и характеризовались снижением вероятности решения задачи на 43% (ВРЗ=57%), а также увеличением времени нахождения и времени выполнения решения задачи соответственно в 2.3 раза ($p<0.01$) и 5.4 раза ($p<0.05$), что свидетельствует о снижении психомоторной активности вследствие влияния изониазида на центральную нервную систему и периферическую иннервацию.

В опытной группе животных, получавших с профилактической целью ЭФЛ за 1 час до введения изониазида, гибели крыс не наблюдалось, однако в 16% случаев зафиксированы слабовыраженные клонико-тонические судороги, при отсутствии изменений со стороны электрокардиограммы. Вероятность решения задачи по спасению из эмоционально-физической экстремальной ситуации на 7 сутки исследования составляла 71.4%, а время выполнения задачи достоверно не отличалось от контроля. Расчетные значения индексов составили: ИПД=1.01 и ИДД=0.89.

Состояние животных в опытной группе, получавших с профилактической целью за 1 час до введения изониазида масло семян амаранта на протяжении всего периода наблюдения характеризовалось менее выраженными симптомами интоксикации, отсутствием гибели крыс, судорог и изменений со стороны электрокардиограммы. Вероятность решения задачи по спасению из эмоционально-физической экстремальной ситуации на 7 сутки исследования составляла 85.7%, время нахождения и времени выполнения решения задачи было достоверно ниже контроля соответственно

в 1.7 раза и 1.9 раза ($p < 0.01$). Согласно расчетам ИПД составил 0.99, ИДД – 0.59, что в целом свидетельствует о нормализации психомоторной и двигательной активности животных, а так же их общего клинического состояния.

Результаты биохимических исследований сыворотки крови, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что шестикратное введение изониазида, равно как и однократный прием его высокой дозы, сопровождаются повреждением печени, что проявляется в статистически значимых изменениях уровня исследуемых биохимических показателей, развитием диффузной жировой дистрофии печени и достоверным увеличением протромбинового времени.

Так, в контрольной группе животных однократное введение изониазида вызывало через 1 час после интоксикации повышение активности АлАТ в 2 раза ($p < 0.05$) относительно показателей животных интактной группы, что свидетельствует о развитии синдрома цитолиза гепатоцитов. Однако уже через 24 часа наблюдалось уменьшение активности АлАТ и АсАТ соответственно на 57.7% на 56.5% ($p < 0.05$), которая прогрессивно

Таблица 1.

Изменение биохимических показателей крови при интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции маслом семян амаранта

Группа	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	Билирубин общий, мкмоль/л	Холестерин общий, ммоль/л
Интакт	55.60±7.75	144.91±21.67	2.56±0.8	1.59±0.13
через 1 час после интоксикации				
Контроль	108.57±11.68*	163.46±13.03	2.32±0.28	1.64±0.62
ЭФЛ	98.94±7.44*	174.52±12.82*	2.67±2.36	1.62±0.12
АМ	72.64±2.73**	207.98±21.59**	1.79±0.1 ⁺	1.80±0.15
через 24 часа после интоксикации				
Контроль	23.49±6.92*	81.92±25.84*	0.98±0.35	3.13±0.80**
ЭФЛ	40.90±4.23**	161.10±17.63 ⁺	2.02±0.23 ⁺	1.82±0.36**
АМ	49.91±4.92 ⁺	167.24±7.80**	1.27±1.30	2.03±0.24**
7 сутки исследования				
Контроль	16.55±6.55*	50.90±7.73*	2.48±0.33	2.24±0.10*
ЭФЛ	22.25±2.07*	139.50±22.31 ⁺	2.43±1.30	2.56±0.45**
АМ	20.54±3.28*	90.41±19.50**	2.30±1.11	2.04±0.17*
14 сутки исследования				
Контроль	43.04±3.91*	202.36±39.31**	1.82±0.32	1.86±0.26
ЭФЛ	46.51±8.55	127.63±8.58 ⁺	2.55±0.1 ⁺	1.92±0.35
АМ	53.71±1.58**	147.16±26.57**	2.50±0.35 ⁺	1.64±0.15

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – достоверность различий при сравнении с интактом; ⁺ - $p < 0.05$; ⁺⁺ - $p < 0.01$ – достоверность различий при сравнении с контролем; * - $p < 0.05$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения

снижалась при дальнейшем моделировании интоксикации. При гистохимическом исследовании срезов печени через 24 часа после интоксикации установлено, что цитоплазма гепатоцитов заполнена мелкими и крупными каплями жира (рис. 1А), что свидетельствует о развитии диффузной жировой дистрофии печени и возможно обусловлено снижением синтеза апопротеидов, которое вызывает нарушение выведения триглицеридов [10]. Признаки жировой дистрофии печени сохранялись на протяжении 10 суток наблюдения, что коррелировало с данными биохимических исследований.

Кроме того, начиная с первых суток исследования, отмечено достоверное увеличение в сыворотке крови концентрации общего холестерина (табл. 1) и ТБК-активных продуктов (табл. 2), удлинение протромбинового времени (табл. 3).

К 14 суткам исследования отмечено увеличение активности АлАТ, однако её уровень был ниже интакта на 22.6% ($p < 0.05$). При этом активность АсАТ превышала показатель животных интактной группы на 39.64% ($p < 0.01$), а протромбиновое время – на 57.5% ($p < 0.05$) (табл. 3). При гистохимическом исследовании срезов печени выявлены остаточные явления жировой дистрофии.

В сыворотке крови животных опытной группы, получавших ЭФЛ наблюдалось достоверное относительно интакта увеличение активности АлАТ и АсАТ соответственно на 77.9% и 20.4%

($p < 0.05$) через 1 час после однократного введения изониазида. Через 24 часа по отношению к контрольной группе было отмечено увеличение активности АлАТ и АсАТ соответственно в 1.7 и 2 раза ($p < 0.05$), уменьшение содержания общего холестерина на 41.8% ($p < 0.01$) и протромбинового времени на 12% ($p < 0.05$) (табл. 1; табл. 3). При гистохимическом исследовании срезов печени жировые капли преимущественно расположены на периферии печеночных балок, что свидетельствует о менее выраженной степени жировой дистрофии (рис. 1Б).

На 7 сутки наблюдения в отличие от показателей животных контрольной группы активность АсАТ и концентрация ТБК-активных продуктов восстанавливались (табл. 2), а протромбиновое время было ниже контроля на 34.9% ($p < 0.05$).

К 14 суткам исследования, в отличие от группы контроля наблюдалась нормализация активности АлАТ. При гистохимическом исследовании срезов печени признаков жировой дистрофии не обнаружено.

Таким образом, введение ЭФЛ с профилактической целью при токсическом повреждении печени, вызванном изониазидом, сопровождалось торможением процессов липопероксидации, достоверным уменьшением относительно контроля протромбинового времени и нормализацией основных биохимических показателей, отражающих функциональное состояние печени.

Таблица 2.

Изменение концентрации ТБК-активных продуктов при интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции маслом семян амаранта, нмоль/л

Группа	Период наблюдения			
	1 час	24 часа	7 сутки	14 сутки
Интакт	19.73±0.73			
Контроль	18.96±1.02	22.38±1.55*	23.64±1.95*	21.56±1.90*
ЭФЛ	18.92±2.29	20.23±2.19	20.04±0.71 ⁺	19.74±0.97
АМ	18.96±0.64*	18.96±0.64 ⁺	19.17±0.09 ^{••}	19.95±1.68

Таблица 3.

Изменение протромбинового времени при интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции маслом семян амаранта, сек

Группа	Период наблюдения		
	24 часа	7 сутки	14 сутки
Интакт	19.3±0.15		
Контроль	26.7±0.41*	40.1±0.91**	30.4±0.64*
ЭФЛ	23.5±0.34 ⁺	26.1±0.61 ⁺	24.6±0.58 ⁺
АМ	24.6±0.11 ^{••}	26.4±0.50 ^{•••}	24.8±0.51 ⁺

Примечание: ЭФЛ – препарат эссенциальных фосфолипидов; АМ – масло семян амаранта; * - $p < 0.05$ – достоверность различий при сравнении с интактом; ⁺ - $p < 0.05$ – достоверность различий при сравнении с контролем; ^{••} - $p < 0.05$ – достоверность различий при сравнении с препаратом сравнения

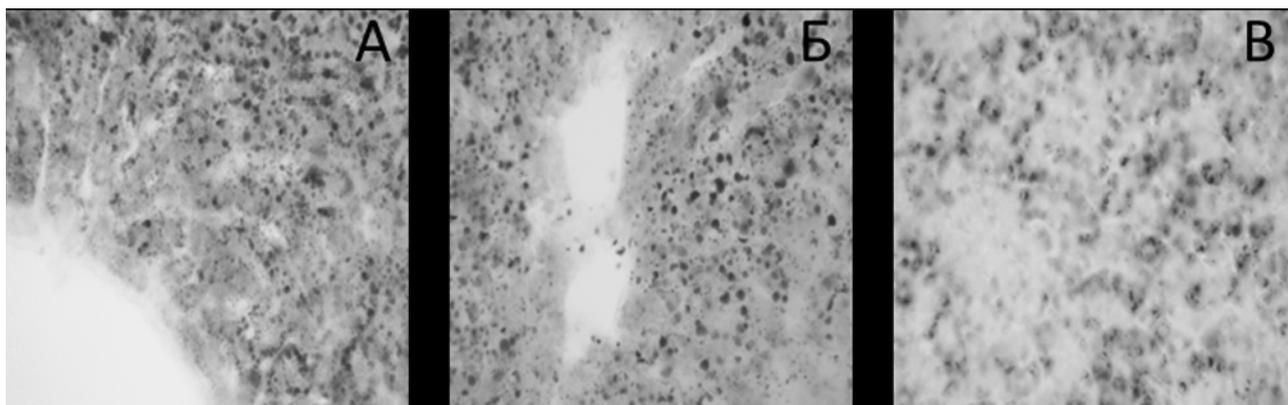


Рис. 1. Гистохимическая картина печени крыс на фоне интоксикации изониазидом и фармакологической коррекции, 1 сутки, окраска – Oil Red O, ув.×400. Обозначения: А – контроль; Б – Эссенциале Н; В – масло семян амаранта

В опытной группе животных, получавших масло семян амаранта, через 1 час после однократного введения изониазида установлено снижение активности АлАТ относительно показателей контроля и препарата сравнения соответственно на 33.1% и на 26.6% ($p<0.05$), что свидетельствует о способности масла семян амаранта предотвращать цитолиз гепатоцитов. Через 24 часа выявленные различия активности аминотрансфераз интактной и опытной групп были статистически не значимы (табл. 1). Содержание в сыворотке крови общего холестерина было ниже контроля на 35.1% ($p<0.05$). Показатель протромбинового времени – выше интакта на 27.5% ($p<0.05$) и ниже времени контроля на 7.8% ($p<0.05$). При гистохимическом исследовании срезов печени наблюдалось сокращение степени и распространенности жировой дистрофии, о чем свидетельствовали расположенные на периферии печеночных балок мелкие жировые капли (рис. 1В). Вышеизложенное свидетельствует о наличии выраженной гепатопротекторной активности масла семян амаранта и согласуется с результатами ранее проведенных исследований [11].

Активность АсАТ нормализовалась на 10 сутки наблюдения, а АлАТ – на 14 сутки. На 14 сутки протромбиновое время было меньше контроля на 18.4% ($p<0.05$). Концентрация общего холестерина на 9.6% ниже интакта ($p<0.01$), что согласно литературным данным связано с перераспределением липидов в бислое мембраны клетки [12, 13]. При гистохимическом исследовании срезов печени признаков жировой дистрофии не обнаружено. Анализ результатов биохимических исследований свидетельствует о том, что масло семян амаранта по сравнению с эссенциальными фосфолипидами оказывает более выраженное гепатопротекторное действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение масла семян амаранта с целью профилактики осложнений, вызванных изониазидом предотвращает гибель животных, уменьшает выраженность симптомов интоксикации, в том числе, развивающихся вследствие повреждающего действия изониазида на периферическую и центральную нервную систему, предотвращает изменения электрической активности сердца, уменьшает распространенность жировой дистрофии печени и выраженность синдрома цитолиза гепатоцитов, способствует сокращению периода нормализации основных биохимических показателей крови. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности применения масла семян амаранта для профилактики осложнений, вызванных изониазидом и открывают перспективы для дальнейшего изучения его нейро- и кардио- и гепатопротекторной активности.

ВЫВОДЫ

Введение крысам изониазида в дозе 542 мг/кг в течение 6 суток вызывает в 33% гибель животных, сопровождается выраженными нарушениями со стороны центральной, периферической нервной системы, сердца, липидного обмена и функций печени.

Профилактическое введение масла семян амаранта (6 суток, доза 600 мг/кг) предотвращает гибель животных, в значительной степени уменьшает проявления нарушений со стороны центральной и периферической нервной системы и сердца, оказывает выраженное гипохолестеринемическое и гепатопротекторное действие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сливкин А.И. Соединения с противотуберкулезной активностью: синтез, структура, механизм действия / А.И. Сливкин. — Воронеж : Издательство Воронежского государственного университета, 2000. — 264 с.
2. Суханов Д.С. Гепатопротекторные средства в терапии поражений печени противотуберкулезными препаратами / Д.С. Суханов, С.В. Оковитый. — Санкт-Петербург: Издательство Тактик-Студио, 2009. — 50 с.
3. Сквален: физиологические и фармакологические свойства / Е.Н. Музалевская [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2015. — № 6. — С. 30-36.
4. Коршунов Д.А. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на метаболические процессы при экспериментальном повреждении печени потенциально гепатотоксическими лекарственными средствами: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Д.А. Коршунов — Томск, 2010. — 26 с.
5. Патент РФ на изобретение № 2526172, МПК А61К36/21. Лечебное средство профилактики и лечения хронических заболеваний печени / В.А. Николаевский, В.И. Золоедов, Н.В. Лобеева, Л.А. Мирошниченко, Е.Н. Музалевская; заявитель и патентообладатель: ООО «Русская Олива», заявл. 10.02.2012, опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. — Москва : Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Патент РФ на изобретение № 2506649, МПК G09B 23/28; А61В5/11. Способ выявления психотропной активности лекарственных и нелекарственных веществ / Ю.Н. Чернов, А.В. Бузлама, Г.А. Батищева, М.В. Васин, В.А. Николаевский, А.И. Сливкин, Е.Н. Музалевская; заявитель и патентообладатель: ФГБОУ ВПО ВГУ, заявл. 28.08.2012, опубл. 10.02.2014, Бюл. №4.
8. Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. — Москва : Медицина, 1977. — 392 с.
9. Сулейманов С.М. Методы морфологических исследований: метод. пособие / С.М. Сулейманов, И.Т. Шапошников, В.В. Авдеев и др. 3-е изд., перераб. и доп. — Воронеж : ВГАУ, 2012. — 103 с.
10. Гепатопротекторные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном / В.И. Смольякова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2011. — № 8. — С. 37-40.
11. Hepatotropic, antioxidant and antitoxic action of amaranth oil / V.A. Nikolaevsky [et al.] // Functional Foods in Health and Disease. — 2014. — Vol. 4, № 5. — P.159 -171.
12. Лаптева Е.Н. Специфическая активность полипренольного препарата «Ропрен» при токсическом поражении печени в эксперименте / Е.Н. Лаптева, В.И. Рошин, В.С. Султанов // Клиническое питание. — 2007. — № 3. — С. 28-32.
13. Шепелева Я.В. Влияние гипербарической оксигенации в клинических режимах на перекисное окисление липидов и антиоксидантную защиту головного мозга здорового организма: дисс. ... канд. мед. наук / Я.В. Шепелева — Воронеж, 2004. — 131с.

*Воронежский государственный университет
Музалевская Е. Н., аспирант кафедры фармакологии фармацевтического факультета.
E-mail: muzalevskaya@pharm.vsu.ru
Тел.: (473) 2530-380*

*Николаевский В. А., д. м. н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru
Тел.: (473) 2530-380,*

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
Чернов Ю. Н., д. м. н., профессор кафедры клинической фармакологии
Тел.: (473) 237-10-11*

*Voronezh State University
Muzalevskaya E. N., post-graduate student, Dept. of pharmacology
E-mail: muzalevskaya@pharm.vsu.ru
Ph.: (473) 2530-380,*

*Nikolaevsky V. A., M. D., Full Professor, Dept. of Pharmacology
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru
Ph.: (473) 2530-380,*

*N. N. Burdenko Voronezh State Medical University
Chernov Y. N., M. D., Full Professor, Dept. of Pharmacology
Ph.: (473) 237-10-11.*