

УДК 615.015 : 615.28

## РАЗВИТИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ИЗОНИАЗИДУ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

К.И. Усов<sup>1,2</sup>, Т.А. Гуськова<sup>3</sup>, Г.Г. Юшков<sup>1</sup>,  
А.В. Машанов<sup>1</sup>, В. В. Игumenъцева<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России», кафедра фармакологии, 664003, г. Иркутск, Российская Федерация

<sup>3</sup>Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», 115191, г. Москва, Российская Федерация

Статья содержит результаты экспериментальных исследований, позволившие установить факт снижения чувствительности и развития токсикологической толерантности (привыкания) к противотуберкулезному препарату «Изониазид», многократно вводимому лабораторным животным в токсических дозах, а также определить скорость развития токсикологической толерантности, максимальную и среднюю продолжительность жизни, тяжесть проявления судорог.

**Ключевые слова:** противотуберкулезный препарат, изониазид, токсикологическая толерантность (привыкание), судороги, эпилептический статус, летальность, средняя продолжительность жизни, скорость развития привыкания, рациональная химиотерапия, экспериментальные исследования.

**Введение.** Основным высокоэффективным синтетическим противотуберкулезным препаратом (ПТП) первого ряда уже более 60 лет остается «Изониазид», он оказывает бактерицидное действие на *Mycobacterium tuberculosis* в стадии размножения, МПК = 0,015 мкг/мл. Изониазид (по химической природе – гидразид изоникотиновой кислоты) действует на возбудителя, расположенного вне- и внутриклеточно (внутриклеточные концентрации в 50 раз превышают внеклеточные). Препарат наиболее эффективен при остро протекающих процессах. Известно, что терапия изониазидом приводит к достаточно быстрому формированию резистентности микобактерий (в 70 % случаев) к действию ПТП «Изониазид» [4] как при монотерапии, так и в условиях различных режимов химиотерапии туберкулеза,

с применением различных ПТП (синтетического ряда и антибиотиков), с включением в их состав изониазида. Проблема развития множественной, а зачастую и мультирезистентности возбудителя туберкулеза к ПТП остается детерминирующей проблемой в определении эффективности и рациональности химиотерапии туберкулеза [14]. Одним из определяющих факторов развития резистентности микобактерий к ПТП, является достаточно продолжительная длительность химиотерапии с применением ПТП. В среднем продолжительность непрерывного, ежедневного приема ПТП составляет от 6 до 16 месяцев [7], что в свою очередь, гипотетически может представлять собой весьма значимую проблему фармакотерапии, связанную с развитием толерантности (привыкания) к длительно применяемым ПТП.

**Усов Константин Ильич (Usov Konstantin Ilich)**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, Иркутская область, г. Ангарск, konstausov@yandex.ru

**Гуськова Татьяна Анатольевна (Guskova Tatijana Anatolievna)**, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки, РФ доктор медицинских наук, профессор, заместитель Председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», 115191, г. Москва, tagus@rambler.ru

**Юшков Геннадий Георгиевич (Jushkov Gennadij Georgievich)**, кандидат медицинских наук, доцент, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, Иркутская область, г. Ангарск, prof\_ushkov@mail.ru

**Машанов Антон Владимирович (Mashanov Anton Vladimirovich)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, Иркутская область, г. Ангарск, mashan\_rpr@mail.ru

**Игumenъцева Виктория Валерьевна (Igmenshcheva Viktoriya Valerevna)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, доцент кафедры «Экологии и безопасности деятельности человека» ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, Иркутская область, г. Ангарск, viktorija\_igumen@mail.ru

Толерантность (привыкание) – это снижение чувствительности к лекарственному средству после его повторного введения, что вынуждает непрерывно увеличивать дозу для того, чтобы вызвать эффект той же интенсивности, имевшей место после введения меньшей дозы, но что, в свою очередь, может привести к усилению его побочных эффектов. Признаком формирования толерантности является частичная или полная потеря терапевтического (лечебного) эффекта при длительном применении лекарственного средства без явлений лекарственной зависимости, то есть без развития пристрастия [6]. Привыкание к лекарственным средствам можно рассматривать как частный случай общебиологического феномена адаптации организма к внешним воздействиям, проявляющийся снижением эффективности при повторных воздействиях одного и того же лекарства на организм. Оно наблюдается у человека и животных, воспроизводится на изолированных органах и отдельных клетках. У одноклеточных, в частности, у микроорганизмов, явления «привыкания» проявляются развитием устойчивости к действию антибиотиков и других химиотерапевтических средств [13].

Определение толерантности, скорости ее развития, с учетом длительности применения изониазида, а также изучение особенностей его токсического действия при длительном применении является актуальной проблемой лекарственной токсикологии, экспериментальной и клинической фармакологии, разрешение которой, несомненно, позволит специалистам более эффективно и рационально организовать фармакотерапию туберкулеза с использованием изониазида.

*Цель исследования.* Определить факт и скорость развития токсикологической толерантности при многократном введении препарата «Изониазид» в условиях токсикологического исследования с использованием крыс в качестве экспериментально-биологических моделей.

**Материалы и методы исследования.** В соответствии с действующими нормативными документами и методическими рекомендациями, принятыми на территории РФ для проведения экспериментальных токсикологических исследований, а также на основе многолетнего экспериментального опыта сотрудников лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики ФГБОУ ВО «АнГТУ» по изучению противотуберкулезных препаратов, в качестве экспериментально-биологической модели были выбраны белые нелинейные крысы-самцы массой 180-200 г [10, 12]. Критериями включения животных в эксперимент являлись: заключение Службы ветеринарии Иркутской области, отсутствие видимых проявлений

заболеваний, однородность по массе тела, в ряде случаев – по анализу периферической крови и некоторым другим показателям в соответствии с принятыми в лаборатории стандартными операционными процедурами и паспортом состояния лабораторных животных. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (вивария) (ветеринарное удостоверение 238 № 0019817). Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями по работе с экспериментальными животными, изложенными в следующих нормативно-правовых документах: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) [8], «Правила надлежащей лабораторной практики» (приложение к приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.) [9] и разрешены локальным этическим комитетом.

Эксперименты по изучению скорости развития толерантности организма животного к изониазиду осуществляли в трех направлениях.

*Первое направление.* Проводилось изучение влияния фиксированных (неизменных на протяжении всего эксперимента) токсических доз изониазида, вводимых ежедневно однократно (1 раз в сутки) до наступления летальности. Изониазид применяли в дозах, дробных от среднесмертельной, установленной и рассчитанной по методу Кербера [17]: 1/2 (600 мг/кг), 1/3 (400 мг/кг), 1/4 (300 мг/кг), 1/5 (240 мг/кг) и 1/10 (120 мг/кг) от  $DL_{50}$  (1200 мг/кг).

В эксперименте осуществляли общее обследование неврологического статуса крыс (ежедневно), оценивали особенности поведения и судороги по шкале Мареша [11] (ежедневно), регистрировали летальность, максимальную и среднюю продолжительность жизни.

В параллельных группах опыта определяли в плазме крови крыс содержание возбуждающих аминокислот. Определение проводили на аминокислотном анализаторе с постколоночной дериватизацией аминокислот с нингидрином «BioChrom 30+» (Великобритания), концентрацию ГАМК определяли по методике Carmona E. [18], экскрецию изониазида и ацетилизониазида в суточной моче крыс определяли по методике [1] с использованием реагента метаванадата аммония, спектрофотометрически; моча собиралась в обменные клетки чешской фирмы Simax.

Рандомизацию крыс на группы проводили по принципу исследуемого диапазона доз; каждая группа состояла из 10 крыс-самцов ( $n = 10$ ) и представляла отдельную серию эксперимента.

*Второе направление.* Проводилось изучение влияния однократных (1 раз в сутки), ежедневно вводимых, возрастающих дробных (от установ-

ленной среднесмертельной дозы) доз изониазида, с оценкой клиники отравления, летальности, максимальной и средней продолжительности жизни. Каждая группа состояла из 10 крыс-самцов ( $n = 10$ ) и представляла единую серию эксперимента.

*Третье направление.* Проводилось установление среднесмертельных доз препарата после длительного введения изониазида крысам (с продолжительностью курса 1, 2, 3 месяца) в максимально суточной дозе 15 мг/кг [7], с учётом коэффициента пересчета с крыс на человека [3]. При установлении среднесмертельных доз изониазида оценивали клинику отравления, определяли среднюю продолжительность жизни крыс. Каждая группа состояла из 10 крыс-самцов ( $n = 10$ ) и представляла отдельную серию эксперимента.

В экспериментах использовали препарат «Изониазид®» производства ОАО «Московское производственное химико-фармацевтическое объединение им. Н.А. Семашко», г. Москва (таблетки, 0,3 г). Животным вводили препарат однократно, внутривенно в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью металлического атравматичного зонда. Дозирование проводили по количеству активного вещества (изониазида) в таблетке, индивидуально для каждого подопытного животного с учетом ежедневного мониторинга массы тела, измеряемого за 30 минут до введения изониазида. Перед введением препарата таблетки растирались в ступке. Однократный объем вводимой суспензии для крыс не превышал 5 мл [15].

Для обработки полученных результатов применялись методы математической статистики, реализованные в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007, входящем в состав лицензионного пакета офисных приложений для комплексной обработки данных Microsoft Office 2007 (Microsoft Co., США); правообладатель лицензии ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет». Вычисляли среднее арифметическое значение ( $M$ ), стандартную ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ). Достоверными считались результаты при  $p \leq 0,05$ . Методики расчета показателей соответствуют общепринятым, изложенным в руководстве по математической статистике для медико-биологических исследований [2].

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные летальности, средней и максимальной продолжительности жизни крыс, в условиях ежедневного перорального введения препарата «Изониазид», в установленной нами ранее среднесмертельной дозе ( $DL_{50} = 1233 \pm 43$  мг/кг – крысы-самцы) [17] и 1/2, 1/3, 1/4 и 1/5 от  $DL_{50}$ , до наступления летальности, приведены в таблице 1. Ранее проведенные нами эксперименты по изучению клиники

острой токсичности изониазида показали, что при его введении в среднесмертельной дозе летальность наступала не позднее первых суток от момента введения, далее животные постепенно выходили из состояния визуальной определяемой интоксикации, и в более поздние сроки наблюдения летальность отсутствовала [16].

Повторное введение среднесмертельной дозы изониазида через 24 ч (2 сутки), крысам, заведомо перенесших острое отравление, вызванное введением  $DL_{50}$  изониазида, приводило к летальности 100 % крыс. Ежедневное введение изониазида в дозе 600 мг/кг (1/2 от  $DL_{50}$ ) приводило к летальности 20 % крыс лишь к концу первой недели введения (на 6-7 сутки введения) и только к концу 3 недели летальность достигла 100 %, максимальная переносимость крыс определялась введением 19 доз 1/2 от  $DL_{50}$ , введение 20 дозы 1/2 от  $DL_{50}$  привело к наступлению 100 %-й летальности – этот феномен можно расценить как истинный признак развития толерантности организма крыс к изониазиду, так как за весь период эксперимента животные выдержали воздействие 10 эквивалентов среднесмертельной дозы изониазида, что определялось полученной крысами суммарной (курсовой) дозы (табл. 1). Применение изониазида в относительно низких дробных дозах (1/3, 1/4, 1/5 от  $DL_{50}$ ) приводило лишь к увеличению скорости развития дозозависимой толерантности крыс к изониазиду и определялась введением, соответственно, 64 (1/3 от  $DL_{50}$ ), 170 (1/4 от  $DL_{50}$ ), 182 (1/5 от  $DL_{50}$ ) доз на курс. Введение изониазида в дозе 1/10 от  $DL_{50}$  приводило к наступлению летальности 10 % крыс, к концу 181 суток. Средняя продолжительность жизни достоверно увеличивалась (табл. 1) в зависимости от кратности применяемых доз изониазида, что определяло и скорость формирования дозозависимой толерантности.

В целом, на протяжении всего эксперимента, в клинической картине острого воздействия (первые 20 суток введения изониазида) и последующего ежедневного введения, длительностью 65, 170, 182 суток (до наступления 100 % летальности крыс) преобладали признаки расстройства функций нервной системы, связанные, по-видимому, с тем, что препарат хорошо и быстро проникает через гематоэнцефалический барьер. Первичная симптоматика проявлялась двумя фазами: торможения и тяжелого двигательного возбуждения, эпистатуса. Фаза двигательного торможения (первая фаза) сопровождалась снижением локомоции (двигательной активности), «замиранием» животных, заторможенной реакцией на свет, звук (продолжительность фазы – 15-40 мин в зависимости от вводимой дозы). Первым, визуально определяемым симптомом приближения фазы «тяжелого двигательного

Таблица 1

**Летальность, средняя и максимальная продолжительность жизни крыс при ежедневном пероральном введении препарата «Изониазид» (n = 50)**

Доза препарата «Изониазид»	Летальность*					Средняя продолжительность жизни, 00:00 – часы, минуты (M ± m)	Максимальная продолжительность жизни**
	Через 24 ч	Через 1 неделю	Через 1 месяц	Через 3 месяца	Через 6 месяцев		
1200 мг/кг (DL <sub>50</sub> )	5/10	5/5	-	-	-	12:59 ± 4,3 (1)	2 суток
600 мг/кг (1/2 от DL <sub>50</sub> )	0/10	2/10	8/8	-	-	243:58 ± 36,5 (2)	20 суток
400 мг/кг (1/3 от DL <sub>50</sub> )	0/10	0/10	4/10	6/6	-	771:16 ± 42,5 (3)	65 суток
300 мг/кг (1/4 от DL <sub>50</sub> )	0/10	0/10	1/10	3/9	6/6	2824:30 ± 401,1 (4)	170 суток
240 мг/кг (1/5 от DL <sub>50</sub> )	0/10	0/10	0/10	2/10	8/8	3526:37 ± 333,8 (5)	182 суток
Коэффициент достоверности между экспериментальными группами (t)						t <sub>1-2</sub> = 7,0; t <sub>1-3</sub> = 17,8; t <sub>1-4</sub> = 7,0; t <sub>1-5</sub> = 10,5	

Примечание: \* – в числителе – количество погибших крыс (летальность), в знаменателе – общее количество животных в группе, с учетом хронологической летальности крыс в экспериментальной группе;

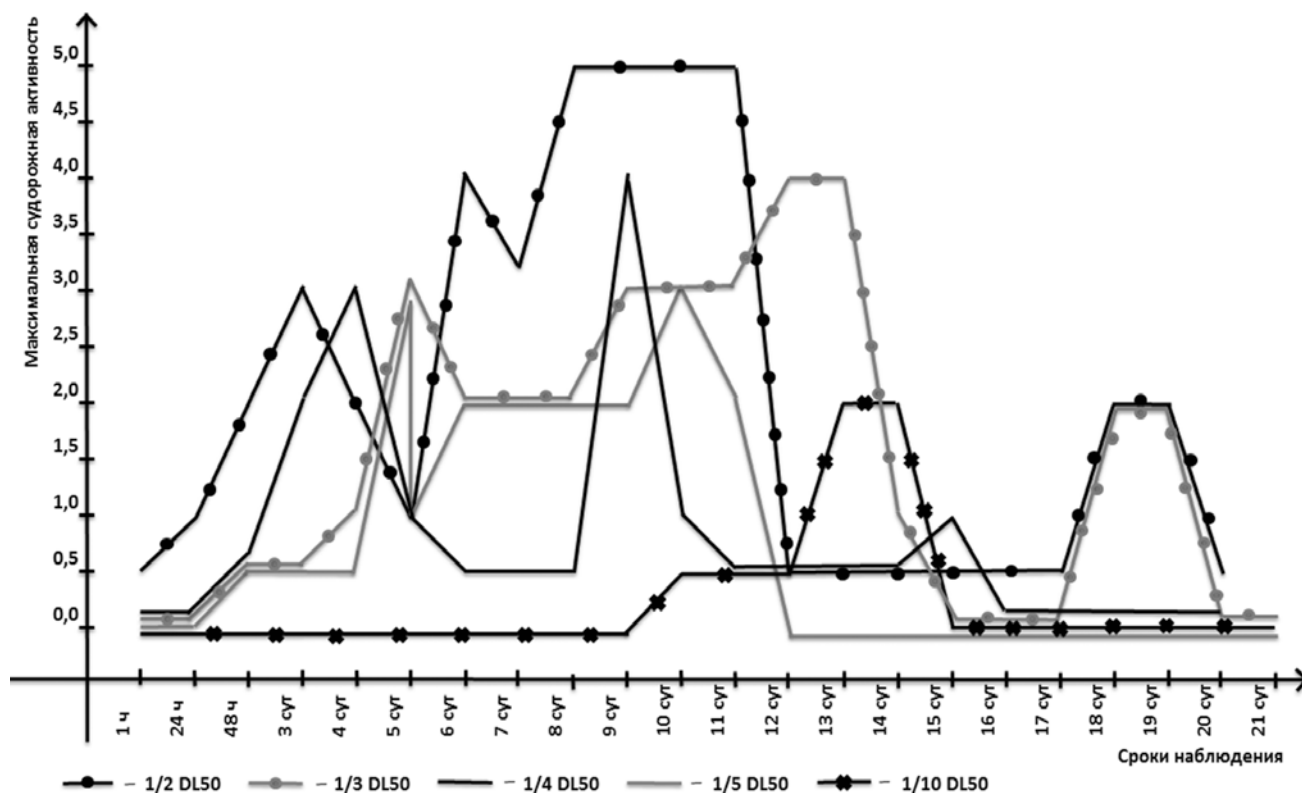
\*\* – максимальное время жизни последнего подопытного животного в экспериментальной группе, установленное по факту определения летальности (наступления биологической смерти);

возбуждения» у крыс, было разведение пальцев передних и задних конечностей в стороны, появление этого клинического симптома у крыс, в 70-80 % случаев, свидетельствовало о начале развития судорожного синдрома, эпистатуса. Фаза двигательного возбуждения, эпистатуса (вторая фаза) возникала вследствие снижения синтеза тормозного нейромедиатора ГАМК путем ингибирования пиридоксальфосфат-зависимого фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты [19] (табл. 2) и характеризовалась повышением рефлекторной возбудимости на свет, звук и переходом от единичных судорожных проявлений к развитию самоподдерживающегося симптоматического эпилептического статуса, с финальным проявлением болезненных для животного генерализованных клонико-тонических судорог, сопровождающихся сильной и достаточно продолжительной ригидностью мышц (тонические судороги) с последующим ритмическим чередованием мышечных сокращений и расслаблений (клонические судороги), а в некоторых случаях –

с наступлением глубокой комы. Определяемая на фоне величин динамического контроля избыточность аспартата и эндогенного глутамата (возбуждающих нейромедиаторов) и снижение концентрации ГАМК, по-видимому, является пусковым механизмом в развитии фазы тяжелого «двигательного возбуждения» (табл. 2).

Максимальная продолжительность эпистатуса – 2 ч при введении дробных доз от среднесмертельной, а при введении среднесмертельной дозы изониазида, максимально – до 5 ч, при соблюдении звукового и светового покоя. Динамика тяжести проявлений фазы «двигательного возбуждения», судорог, эпистатуса, представлена графической зависимостью от продолжительности ежедневного введения изониазида (рис. 1).

Максимальный судорожный синдром проявлялся при введении изониазида в дозе 600 мг/кг (1/2 от DL<sub>50</sub>), на 8-11 сутки у крыс формировался эпистатус с проявлением болезненных клонико-тонических судорог. Судороги повторно инициировались при внешнем звуковом раздра-



**Рис. 1.** Динамика тяжести судорог у крыс в фазу «двигательного возбуждения»

жении, в 30-50 % случаев с последующим вхождением животных в состояние глубокой комы и к 60 %-й летальности крыс в группе. В последующие 12-17 суток развивался рефрактерный (бессудорожный) период, последующее формирование судорожного синдрома проявлялось со значительно меньшей интенсивностью (рис.1), с проявлением лишь атипичных минимальных судорог, вздрагиванием всего тела, напоминающим озноб при лихорадке и эпизодами клонуса мышц головы, конечностей, глазные щели были прикрыты. К 20 суткам наступала 100 % летальность всех подопытных крыс, получавших изониазид в дозе 600 мг/кг (суммарная курсовая доза 12 г/кг). Интенсивность проявления судорог носила дозозависимый характер. К 21-м суткам ежедневного введения изониазида практически во всех группах наступал «большой» рефрактерный период, что было расценено нами, как наступление этапа стойкой толерантности к изониазиду, особенно показательного при введении изониазида в дозах 300 и 240 мг/кг (табл. 1). При введении изониазида в этих дозах, начиная с 2 месяца введения, наблюдалось достоверное повышение массы тела, средняя масса тела крыс в подопытных группах на конец 4 месяца достигла максимума  $292,0 \pm 3,1$  г (при введении изониазида в дозе 300 мг/кг),  $302,2 \pm 2,8$  г (при введении

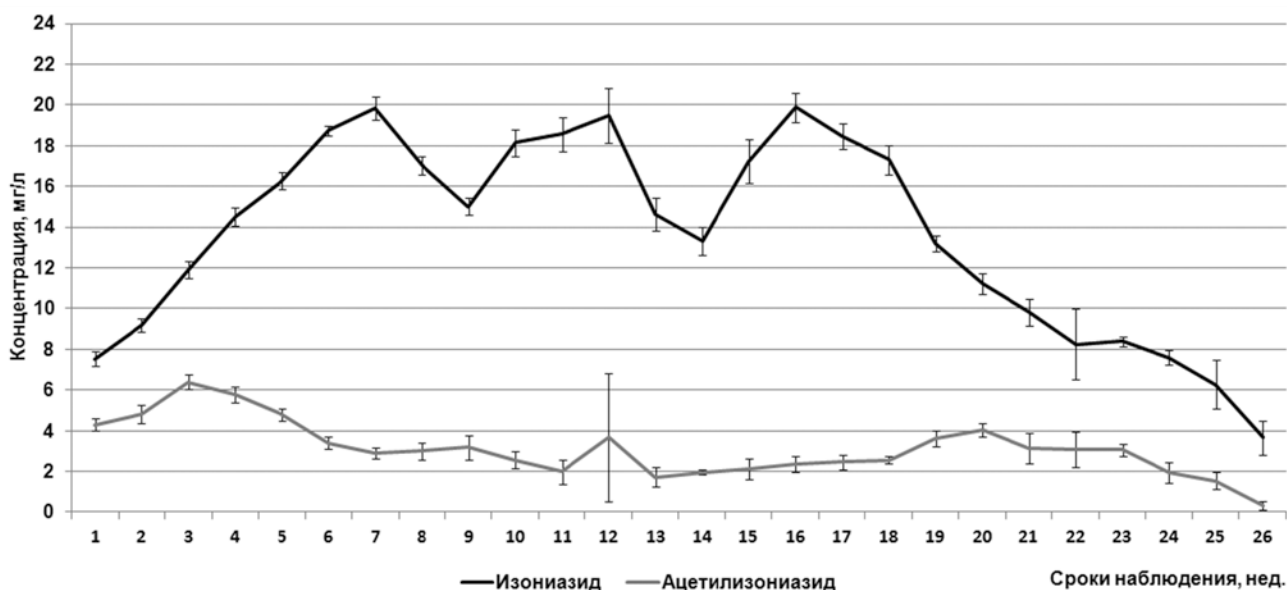
изониазида в дозе 240 мг/кг), а у крыс из групп динамического контроля данный показатель составил, соответственно,  $186,8 \pm 2,6$  и  $192,2 \pm 3,0$  г при  $p \leq 0,05$ . Прирост массы тела можно объяснить относительно хорошим потреблением корма у крыс и преобладанием синтетических процессов обмена на фоне воздействия изониазидом, судороги регистрировались в этот период крайне редко и только у некоторых крыс. Как правило, через 30-40 минут после введения изониазида у крыс снижалась двигательная активность и наступал чуткий сон, при этом животные занимали характерную для этого периода наблюдения позу: скручиваясь в комочек, с подгибанием головы внутрь тела, оставаясь при этом на двух задних конечностях на опоре пола клетки, продолжительность сна – до 1 часа, после пробуждения признаки интоксикации визуально «стирались» и общее, визуально определяемое состояние подопытных крыс не отличалось от контрольных животных, что свидетельствовало о формировании стойкой толерантности крыс к ежедневно вводимым токсическим дозам изониазида. В более поздний период наблюдения (к концу 5-6 месяца непрерывного введения изониазида в дозах 300 и 240 мг/кг) следовало проявление вторичной симптоматики нейроорганотоксического генеза, с усиливающимся во времени проявлением

Таблица 2

**Динамика сопряженной нейрометаболической системы: эндогенный глутамат-ГАМК и аспартата в крови крыс при пероральном введении препарата «Изониазид», n = 180**

Доза препарата (доля от DL <sub>50</sub> )	Показатель, нмоль/мл	Через 1 ч после 1-го введения	10 сутки введения	20 сутки введения
1200 мг/кг (DL <sub>50</sub> )	Аспартат	17,2 ± 1,1	100 % летальность	100 % летальность
	Глутамат	40,1 ± 2,8		
	ГАМК	8,5 ± 1,4		
	ГАМК / глутамат	0,2		
600 мг/кг (1/2 от DL <sub>50</sub> )	Аспартат	6,9 ± 0,8*	13,87 ± 0,8	100 % летальность
	Глутамат	20,8 ± 0,7	33,9 ± 3,0	
	ГАМК	29,0 ± 2,1	12,2 ± 1,6	
	ГАМК / глутамат	1,4	0,3	
400 мг/кг (1/3 от DL <sub>50</sub> )	Аспартат	4,5 ± 1,2	8,1 ± 2,1	6,8 ± 1,4
	Глутамат	21,5 ± 1,0	29,5 ± 0,6	21,8 ± 2,6
	ГАМК	34,1 ± 2,8	20,8 ± 3,4	30,9 ± 1,2
	ГАМК / глутамат	1,6	0,7	1,4
300 мг/кг (1/4 от DL <sub>50</sub> )	Аспартат	4,8 ± 0,4	7,9 ± 0,5	3,9 ± 0,3*
	Глутамат	18,1 ± 1,2	24,1 ± 0,8	20,0 ± 1,2
	ГАМК	38,5 ± 3,1*	32,1 ± 2,2*	42,0 ± 4,0*
	ГАМК/глутамат	2,1	1,3	2,1
240 мг/кг (1/5 от DL <sub>50</sub> )	Аспартат	4,6 ± 0,9*	10,1 ± 0,3	4,2 ± 0,6*
	Глутамат	16,0 ± 0,8*	30,2 ± 2,3	16,2 ± 0,4*
	ГАМК	42,0 ± 5,2*	18,2 ± 3,0	40,7 ± 4,0*
	ГАМК / глутамат	2,6	0,6	2,5
120 мг/кг (1/10 от DL <sub>50</sub> )	Аспартат	5,5 ± 0,5	3,8 ± 0,7*	4,0 ± 0,6*
	Глутамат	17,2 ± 1,1*	15,5 ± 1,6*	18,1 ± 1,2
	ГАМК	40,0 ± 4,0*	42,3 ± 2,1*	45,2 ± 3,9*
	ГАМК / глутамат	2,3	2,7	2,5
Динамический контроль	Аспартат	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,5
	Глутамат	14,7 ± 0,9	14,4 ± 1,2	15,2 ± 0,5
	ГАМК	44,6 ± 4,1	44,1 ± 2,3	43,2 ± 3,5
	ГАМК / глутамат	3,0	3,1	2,8

Примечание: \* – различия статистически недостоверные при p ≤ 0,05



**Рис. 2.** Концентрационные профили зависимости изменения концентрации изониазида и ацетилизониазида от длительности введения изониазида в разовой ежедневной дозе 240 мг/кг (1/5 от DL<sub>50</sub>)

следующих симптомов: 1) поза Вернике-Манна у 30 % подопытных крыс, проявляющаяся центральным гемипарезом статического характера и диагностированным односторонним спастическим напряжением мышц сгибателей правой передней лапы и разгибателей задней правой лапы у крыс, с ухудшением состояния ближе к концу 6 месяца эксперимента; 2) изменение мышечного тонуса (мышечной дистонии), в сторону его снижения – гипотонии (у 30 % подопытных крыс), вплоть до полной атонии; 3) общая заторможенность, вялость, сонливость, малоподвижность, снижение потребления корма и потеря способности ухода за собой. За 3-6 дней до наступления биологической смерти у 20 % подопытных крыс диагностировали хромодакриаррею (наличие красных порфириновых корочек вокруг глаз) и порфириновый эпистаксис (выделения порфирина из полости носа).

В целом к шестому месяцу введения изониазида у крыс отмечено усиление процесса биологического старения: зубы и когти приобретали желто-коричневый цвет, выпадали, наблюдалась нефрагментарная алопеция по всей площади поверхности тела крыс, шерсть выглядела неопрятно. После 24-25 недель ежедневного введения изониазида у крыс развивалась поздняя диарея (30-40 % случаев) или обстипация (60-70 %), по-видимому, вследствие хронической фармакологической стимуляции изониазидом моторной активности кишечника. Все проявления вторичной симптоматики свидетельствовали о развитии признаков функциональной кумуляции на фоне определяемого снижения экскреции изониазида через почки у животных, на поздних сроках на-

блюдения (рис. 2). Введение изониазида в дозе 120 мг/кг (1/10 от DL<sub>50</sub>), приводило к отсроченным во времени эффектам с более низкой интенсивностью симптоматического проявления признаков интоксикации, судорожный синдром проявлялся с максимальной силой только к 13-14 суткам введения изониазида и был оценен максимально в 2 балла по шкале Мареша (рис. 1). Наблюдения, проводимые нами, после 15 суток введения изониазида в дозе 120 мг/кг свидетельствовали о значительном улучшении состояния крыс, которое проявлялось отсутствием судорог, физиологически нормальной двигательной активностью и поддержанием позы животного, хорошим потреблением корма, отсутствием патологических рефлексов и выделений из естественных отверстий. Начиная с 4 месяца введения, у подопытных животных отмечен достоверный прирост массы которая к 6 месяцу достигла  $322,6 \pm 4,3$  г, по сравнению с величинами, полученными от групп крыс динамического контроля  $198,1 \pm 2,9$  г, при  $p \leq 0,05$ . Только к концу 5 месяца введения была отмечена летальность одного животного (181 сутки введения), суммарная курсовая доза изониазида для первого погибшего животного составила 21,72 г/кг, что свидетельствует о выработке стойкой толерантности к токсической дозе изониазида.

Изучение динамики концентрации изониазида и ацетилизониазида, экскретируемого почками в мочу у подопытных животных, получавших препарат в дозе 1/5 от DL<sub>50</sub> (рис. 2), позволило установить, что количество определяемого изониазида статистически достоверно повышалось, а количество определяемого ацетилизониазида снижа-

Таблица 3

**Динамика летальности крыс при пероральном введении изониазида в постоянно возрастающих дробных дозах от установленной среднесмертельной дозы изониазида**

Показатели	«Лестница» исследуемых возрастающих доз изониазида					
	120 мг/кг (1/10 от DL <sub>50</sub> )	240 мг/кг (1/5 от DL <sub>50</sub> )	300 мг/кг (1/4 от DL <sub>50</sub> )	400 мг/кг (1/3 от DL <sub>50</sub> )	600 мг/кг (1/2 от DL <sub>50</sub> )	1200 мг/кг (DL <sub>50</sub> )
Длительность введения изониазида, дни	10	5	4	3	2	1
Схема введения изониазида в возрастающих дозах	с 1 по 10 сутки	с 11 по 15 сутки	с 16 по 19 сутки	с 20 по 22 сутки	с 23 по 24 сутки	25 сутки
Суммарная доза изониазида на конец каждого курса введения, мг/кг	1200	2400	3600	4800	6000	7200
Максимальное проявление судорог (баллы по шкале Мареша*)	0,5	2	4	2	3	4
Процент проявления судорог у крыс, %	20	70	100	44,5	12,5	62,5
Летальность**	0/10	0/10	1/10	1/9	0/8	0/8
Максимальная продолжительность жизни погибших крыс*** (00:00 - часы, минуты)	-	-	432:55	509:20	-	-

*Примечание:* \* – 0,5 балла (абerrации в поведении), 2 балла (атипичные миоклонические судороги, слабые и умеренные вздрагивания всего тела), 3 балла (минимальные судороги с проявлением клонуса мышц головы и конечностей, сильными вздрагиваниями всего тела с отрывом от пола), 4 балла (тонические судороги тела, клонус передних конечностей, поза «кенгуру»). \*\* – в числителе: количество погибших крыс (летальность), в знаменателе – общее количество животных в группе, с учетом хронологической летальности крыс в экспериментальной группе. \*\*\* – максимальное время жизни подопытного животного в экспериментальной группе, установленное по факту определения его летальности (наступления биологической смерти).

лось прямо пропорционально в зависимости от длительности введения препарата. Полученные данные свидетельствует о хронологическом развитии метаболического синдрома у подопытных крыс, направленного на формирование форсированного выведения изониазида из организма, что было тормозным механизмом в отсутствие проявлений признаков материальной кумуляции изониазида. Установленный феномен, а также оценка динамики сопряженной нейрометаболической системы: эндогенный глутамат-ГАМК и аспартат в крови крыс (табл. 2), в определенной степени объясняет развитие стойкой толерант-

ности к ежедневному введению изучаемой токсической дозы изониазида.

Изучение динамики формирования толерантности к изониазиду в исследованиях с введением постоянно возрастающих, кратных от среднесмертельной дозы изониазида, показало развитие стойкой толерантности организма крыс к действию токсических доз изониазида по летальному эффекту (табл. 3).

На 25 сутки на фоне введения возрастающих доз изониазида, введение крысам среднесмертельной дозы изониазида (1233±43 мг/кг, табл. 3) привело к отсутствию летальности крыс. Судоро-



Таблица 4

**Динамика летальности крыс при ежедневном пероральном введении препарата «Изониазид» в течение 30, 60 и 90 дней с последующим определением DL<sub>50</sub> (n = 60)**

Длительность введения препарата	Ежедневное введение препарата			Однократное введение препарата после курсового применения		
	Доза препарата в сутки	Суммарная (курсовая) доза препарата, мг/кг	Летальность крыс	DL <sub>50</sub> ' установленной на интактных крысах, мг/кг	Летальность крыс после введения DL <sub>50</sub> ' установленной на интактных крысах	DL <sub>50</sub> на 31, 61, 91 сутки от начала эксперимента, мг/кг
30 суток	15 мг/кг	450 мг/кг	0/10	1233 ± 43	3/10	1350 ± 43
60 суток	15 мг/кг	900 мг/кг	0/10	1233 ± 43	1/10	1566 ± 38
90 суток	15 мг/кг	1350 мг/кг	0/10	1233 ± 43	0/10	1810 ± 48

рожная активность после введения на 25 сутки изониазида была максимальна, и в фазу тяжелого двигательного возбуждения у 62,5 % крыс судороги достигали 4-5 баллов по шкале Мареша, в 38 % случаев после клонических, тонических или тонико-клонических судорог наступало состояние глубокой комы, средней продолжительностью 01 час 27 минут ± 12,74, с последующим самостоятельным выходом животных из состояния «изониазидовой» комы. В целом, изучение процесса формирования толерантности к изониазиду в эксперименте с лестничным наращиванием токсических доз изониазида, привело к летальности лишь 20 % крыс. Оценивая токсикологическую толерантность к изониазиду в процентах, по летальному эффекту она оказалась равна 80 %.

Изучение курсового введения изониазида в дозе 15 мг/кг в течение 30, 60 и 90 суток показало снижение чувствительности крыс при введении им среднесмертельной дозы вследствие развития токсикологической толерантности организма крыс к изониазиду (табл. 4).

Процент повышения установленных среднесмертельных доз изониазида у крыс, предварительно получавших курсами изониазид в дозе 15 мг/кг, с продолжительностью курсов 30, 60 и 90 суток, составил соответственно: 9 % → 21 % → 32 %, что свидетельствует о формировании токсикологической, дозозависимой, стойкой толерантности организма крыс к изониазиду. Изучение средней продолжительности жизни погибших животных за время наблюдения не выявило статистически достоверных отличий. Клиническая картина интоксикации, в целом, развивалась однотипно, как и при однократном введении в эксперименте по установлению па-

раметров острой токсичности, так и после курсового применения: гибель животных наступала в состоянии эпистатуса.

Исследования по введению изониазида в разное время суток продемонстрировали тенденцию к усилению скорости развития толерантности при применении препарата в 22 часа вечера.

**Заключение.** Проведенные экспериментальные исследования позволили установить факт и скорость развития толерантности к изониазиду в условиях токсикологического эксперимента, а также определить максимальную переносимость крысами токсических доз изониазида, в зависимости от длительности введения препарата. В экспериментах по изучению введения возрастающих токсических доз изониазида, включая среднесмертельную, была определена 80 %-я стойкая толерантность к изониазиду. Длительное введение изониазида, в дозе 15 мг/кг в течение 90 суток с последующим введением среднесмертельной дозы приводило к отсутствию летальности, что также свидетельствует о формировании стойкого привыкания организма крыс к изониазиду. В основе механизмов развития привыкания к изониазиду может лежать индукция микросомальных ферментов, известно, что изониазид индуцирует изофермент 2E1 цитохрома P-450 [5]. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы при формировании рациональной фармакотерапии и фармакологической профилактики туберкулеза с применением изониазида, а также для дальнейшего изучения факторов, влияющих на усиление или ослабление скорости формирования толерантности, что особенно актуально при применении комбинаций противотуберкулезных лекарственных средств, содержащих изониазид.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гармонов С.Ю., Шитова Н.С., Яковлева (Жарехина) А.В., Юсупов Р.А. Метод косвенного определения активности N-ацетилтрансферазы при использовании в качестве реагента метаванадата аммония для оценки экскреции изониазида с мочой человека. Химио-фармацевтический журнал. 2008; 42 (8): 49-53.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика (пер. с англ.) / Москва: Практика, 1999; 459.
3. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Москва: ИД «Русский врач»; 2003; 154.
4. Изониазид (Isoniazid), инструкция по применению. Available at: <http://www.medicinform.net/spravka/z/z104.htm>.
5. Клиническая фармакология: национальное руководство / под ред. Ю.Б. Белоусова, В.Г. Кукеса, В.К. Лепихина, В.И. Петрова. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014; 976.
6. Куценко С.А. Основы токсикологии. Available at: URL: <http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology/#contents1p>.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Москва: Новая Волна, 2012; 1216.
8. О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных: приказ МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755. Available at: URL: <http://www.vita.org.ru/exper/order-peotrovsky.htm>.
9. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики: приказ министерства здравоохранения и социального развития РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н. Available at: <http://www.docs.cntd.ru/document/420350679>.
10. РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». Москва; 1991.
11. Редкозубова О.М. Особенности развития эпилептического статуса и способов его купирования у крыс разного возраста на литий-пилокарпиновой модели: дис. канд. биол. наук / М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007; 200.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. ЧАСТЬ ПЕРВАЯ. МОСКВА: ГРИФ И К; 2012
13. Соловьев А.И. Почему организм привыкает к лекарственным средствам и можно ли с этим бороться? Фармацевт Практик. 2016; 5. Available at: URL: <http://www.fp.com.ua/articles/pochemu-organizm-privyikaet-k-lekarstvennyim-sredstvam-i-mozhno-li-s-etim-borotsya/>.
14. Стерликов С.А. Эффективность лечения пациентов с мультирезистентным туберкулезом в Российской Федерации и пути ее повышения. Здравоохранение Российской Федерации. 2014; 58 (5): 26-29.
15. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Онкиенко Ф.А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте. Москва: Медицина; 1978.
16. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г., Машанов А.В. Влияние хронобиологических ритмов на токсичность противотуберкулезного препарата «Изониазид» в условиях эксперимента. Токсикологический вестник. – 2016; 2: 31-36.
17. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г., Машанов А.В. Чувствительность животных различных возрастных групп к изониазиду в условиях токсикологического эксперимента. Токсикологический вестник. 2016; 5: 36-43.
18. Carmona E., Gomes C., Trolin G. Purification of GABA on Small Columns of Dowex 50W; Combination with a Method for Separation of Biogenic Amines. Acta Pharmacol. et Toxicol. 1980; 46: 235-240.
19. Eyüboğlu T., Derinöz O. Rhabdomyolysis due to Isoniazid Poisoning Resulting from the Use of Intramuscular Pyridoxine. Turkish Journal of Pediatrics. 2013; 55: 328-330.
1. Garmonov S. Yu., Shitova N. S., Yakovleva (Zharekhina) A. V., Yusupov R. A. Indirect Determination of N-Acetyltransferase Activity Using Ammonium Methavanadate Reactant for Evaluating Isoniazid Excretion with Human Urine. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2008; 42 (8): 49-53.
2. Glants S. Primer of Biostatistics. Moscow: Praktika, 1999 (in Russian).
3. Guskova T. A. Toxicology of drugs. Moscow: ID «Russkiy vrach», 2003 (in Russian).
4. Isoniazid, instruction manual. Available at: <http://www.medicinform.net/spravka/z/z104.htm> (accessed 23 January 2017) (in Russian).
5. Clinical pharmacology: national leadership. Moscow: GEOTAR-Media, 2014 (accessed 23 January 2017) (in Russian).
6. Kutsenko S. A. Fundamentals of toxicology. Available at: URL: <http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology/#contents1p> (accessed 20 January 2017) (in Russian).
7. Mashkovskiy M. D. Medicines. Moscow: Novaya Volna, 2012 (in Russian).
8. On measures on further improvement of the organizational forms of work with the use of experimental animals. Available at: <http://www.vita.org.ru/exper/order-peotrovsky.htm> (accessed 5 May 2016) (in Russian).
9. Approval of the rules of good laboratory practice. Available at: <http://www.docs.cntd.ru/document/420350679> (accessed 20 January 2017) (in Russian).
10. RD 64-126-91. Terms of preclinical safety evaluation of pharmacological substances (GLP). Moscow; 1991 (in Russian).
11. Redkozubova O. M. Features of development of status epilepticus, and edema in rats of different ages on lithium-pilocarpine model. Cand. biol. sci. diss. Moscow: MGU, 2007; 200 (in Russian).
12. The guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Moscow; 2012 (in Russian).
13. Solovov A. I. Why the Body Gets Used to the Medicines and Whether to Deal with it? Farmatsevt Praktik. 2016; 5. Available at: URL: <http://www.fp.com.ua/articles/pochemu-organizm-privyikaet-k-lekarstvennyim-sredstvam-i-mozhno-li-s-etim-borotsya/> (accessed 20 January 2017) (in Russian).
14. Sterlikov S. A. The Effectiveness of Treatment of Patients with Multiresistant Tuberculosis in the Russian Federation. Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii. 2014; 58 (5): 26-29 (in Russian).
15. Trakhtenberg I. M., Sova R. E., Sheftel V. O., Onikienko F. A. Performance standards in laboratory animals in toxicological experiment. Moscow; 1978 (in Russian).
16. Usov K. I., Guskova T. A., Jushkov G. G., Mashanov A. V. The influence of chronobiological rhythms on the toxicity of anti-tuberculosis drug «isoniazid» in the experiment. Toksikologicheskii vestnik. 2016; 2: 31-36 (in Russian).
17. Usov K. I., Guskova T. A., Jushkov G. G., Mashanov A. V. The Sensitivity of Animals of Different Age Groups to Isoniazid in Conditions Toxicological Experiment. Toksikologicheskii vestnik. 2016; 5: 36-43 (in Russian).
18. Carmona E., Gomes C., Trolin G. Purification of GABA on Small Columns of Dowex 50W; Combination with a Method for Separation of Biogenic Amines. Acta Pharmacol. et Toxicol. 1980; 46: 235-240.
19. Eyüboğlu T., Derinöz O. Rhabdomyolysis due to Isoniazid Poisoning Resulting from the Use of Intramuscular Pyridoxine. Turkish Journal of Pediatrics. 2013; 55: 328-330.

K. I. Usov<sup>1,2</sup>, T. A. Guskova<sup>3</sup>, G. G. Jushkov<sup>1</sup>, A. V. Mashanov<sup>1</sup>, V. V. Igumensheva<sup>1</sup>

## THE DEVELOPMENT OF TOXICOLOGICAL TOLERANCE TO ISONIAZID IN EXPERIMENT

<sup>1</sup>Research Institute of Biophysics, Test Laboratory Center, Angarsk State Technical University, 665835, Angarsk, Russian Federation.

<sup>2</sup>Irkutsk State Medical University, Ministry of Health of Russia, 664003, Irkutsk, Russian Federation.

<sup>3</sup>Non-commercial partnership for healthcare assistance «Scientific Center of Quality Control», 115191 Moscow, Russian Federation.

Results of experimental studies are reported that made it possible to establish decrease in sensitivity and the development of toxicological tolerance (addiction) to the anti-tuberculosis drug “Isoniazid” repeatedly administered to laboratory animals in toxic doses and to determine growth rate of the toxicological tolerance development, maximum and average life expectancy, severity of seizures.

**Key words:** anti-tuberculosis preparation, isoniazid, toxicological tolerance (addiction), convulsions, epileptic status, lethality, life expectancy, rate of addiction development, rational chemotherapy, experimental studies.

Материал поступил в редакцию 09.02.2017 г.