



Особенности гепатотоксических реакций, вызванных комплексом противотуберкулезных препаратов первого ряда, у крыс с разным фенотипом ацетилирования

Г. Н. МОЖОКИНА, А. В. КАЗАКОВ, Ю. Р. ЗЮЗЯ, Л. Ю. ПЕТРОВА

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний», Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: изучение в эксперименте особенностей проявления гепатотоксических реакций на комплекс противотуберкулезных препаратов с включением изониазида и рифампицина у крыс с разным фенотипом ацетилирования.

Материал и методы. Моделировали поражение печени у крыс, старых самок, относящихся к фенотипу быстрого ацетилирования, и у половозрелых самцов, относящихся к фенотипу медленного ацетилирования, комплексом основных противотуберкулезных препаратов, которые вводили 14 дней. Оценивали гепатотоксические реакции по клиническим наблюдениям за крысами, биохимическим параметрам и морфологическим изменениям печени, которые сравнивали с интактными животными.

Результаты исследования: у крыс-самок (быстрых ацетиляторов изониазида) преобладали признаки цитолитического механизма повреждения печени (более значимое повышение активности АЛТ, выраженная длительность тиопенталового сна, выраженная гидropическая дистрофия гепатоцитов с наличием некроза гепатоцитов, венозное полнокровие и отек портальных трактов). У самцов (с фенотипом медленного ацетилирования изониазида) установлено значительное повышение содержания общего и прямого билирубина, активности АСТ и в меньшей степени АЛТ, т. е. признаки смешанного механизма повреждения печени (холестатического и цитолитического).

Ключевые слова: противотуберкулезные препараты, фенотипы ацетилирования, гепатотоксические реакции, эксперимент, крысы

Для цитирования: Можоккина Г. Н., Казаков А. В., Зюзя Ю. Р., Петрова Л. Ю. Особенности гепатотоксических реакций, вызванных комплексом противотуберкулезных препаратов первого ряда, у крыс с разным фенотипом ацетилирования // Туберкулез и болезни лёгких. – 2020. – Т. 98, № 7. – С. 51-55. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-7-51-55>

Parameters of hepatotoxic reactions caused by the combination of first line anti-tuberculosis drugs in rats with different acetylation phenotypes

G. N. MOZHOKINA, A. V. KAZAKOV, YU. R. ZYUZYA, L. YU. PETROVA

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

ABSTRACT

The objective: in the experiment, to study specific parameters of manifestations of hepatotoxic reactions to the combination of anti-tuberculosis drugs containing isoniazid and rifampicin in rats with different acetylation phenotypes.

Subjects and methods. Liver damage was modeled in rats, old females, belonging to the phenotype of rapid acetylation, and in mature males, belonging to the phenotype of slow acetylation, with a combination of basic anti-tuberculosis drugs, which were administered for 14 days. Hepatotoxic reactions were assessed by clinical observations of rats, biochemical parameters and morphological changes in the liver, which were compared with intact animals.

Results of the study: in female rats (fast acetylators of isoniazid), signs of the cytolytic mechanism of liver damage prevailed (more significant elevation of ALT activity, pronounced duration of thiopental sleep, pronounced hydropic degeneration of hepatocytes with the presence of hepatocyte necrosis, venous congestion and edema of the portal tracts). In males (with the phenotype of slow acetylation of isoniazid), a significant elevation of total and direct bilirubin levels, AST activity and, to a lesser extent, ALT were observed, i.e., signs of a mixed mechanism of liver damage (cholestatic and cytolytic).

Key words: anti-tuberculosis drugs, acetylation phenotypes, hepatotoxic reactions, experiment, rats

For citations: Mozhokina G.N., Kazakov A.V., Zyuzya Yu.R., Petrova L.Yu. Parameters of hepatotoxic reactions caused by the combination of first line anti-tuberculosis drugs in rats with different acetylation phenotypes. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, Vol. 98, no. 7, P. 51-55. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-7-51-55>

Для корреспонденции:

Можоккина Галина Николаевна
E-mail: mojokina@mail.ru

Correspondence:

Galina N. Mozhokina
Email: mojokina@mail.ru

Гепатотоксические реакции (ГТР) у больных туберкулезом, получающих противотуберкулезные препараты (ПТП), отмечаются, по данным разных авторов, в 44-60% случаев и проявляются нарушением дезинтоксикационной, белковосинтетической и других функций печени [6]. Согласно исследованиям, впервые выявленных больных туберкулезом и у больных, получавших лечение по 1-му режиму химиотерапии, основными виновниками развития

ГТР являлись рифампицин (67% случаев), пипразинамид (30%) и изониазид (7%) [3].

Однако рифампицин является индуктором экспрессии ряда ферментов, осуществляющих реакцию окисления целого ряда лекарственных средств в микросомах гепатоцитов, и самоиндуктором, ускоряющим собственную биотрансформацию. Вариабельность фармакокинетики рифампицина (скорость его экскреции) ассоциирована с феноти-

пом ацелирования изониазида [7]. Метаболизм изониазида в организме осуществляется в основном ферментом N-ацетилтрансферазой 2-го типа (NAT2), активность которого определяет скорость ацелирования изониазида до нетоксичных продуктов. В соответствии с генетическими различиями активности фермента выделяют быстрые и медленные ацелиаторы. У медленных ацелиаторов снижается скорость инактивации изониазида путем ацелирования, происходит накопление токсичных промежуточных соединений. Один из продуктов метаболизма изониазида – ацетилгидразин – может окисляться ферментом из семейства цитохромов P450 (CYP2E1) до токсичных веществ, способных напрямую разрушать гепатоциты или вызывать аутоиммунные реакции. Одновременный прием рифампицина и изониазида приводит к ускорению метаболизма изониазида, накоплению его токсичных метаболитов, что увеличивает риск возникновения гепатита. В свою очередь изониазид уменьшает связывание рифампицина с белками крови, что приводит к увеличению концентрации последнего и вероятности токсического поражения печени [4].

Цель исследования: изучение в эксперименте особенностей проявления ГТР на комплекс ПТП с включением изониазида и рифампицина у крыс с разным фенотипом ацелирования.

Материал и методы

Исследования проводились на 32 беспородных белых крысах, самцах и самках, которых получали из питомника «Андреевка» РАН. По данным литературы [1, 2], беспородные старые самки крыс являются быстрыми ацелиаторами изониазида, половозрелые самцы крыс – медленными ацелиаторами. Для создания модели поражения печени у быстрых ацелиаторов использовали 8 самок в возрасте 11-12 мес. и массой от 280 до 330 г; у медленных ацелиаторов – 8 самцов в возрасте 6-7 мес. и массой от 220-250 г. Комплекс ПТП вводили перорально в 1%-ном крахмальном геле ежедневно без перерывов в течение 14 дней в следующих дозах: изониазид – 50 мг/кг (для медленных ацелиаторов) или 70 мг/кг (для быстрых ацелиаторов), рифампицин – 50 мг/кг; пиразинамид – 250 мг/кг; этамбутол – 200 мг/кг. Крысам контрольной группы (8 самок и 8 самцов) вводили 1%-ный крахмальный гель в аналогичном объеме. Все крысы содержались на низкобелковой диете, т. к. низкобелковое питание (хлеб и вода) способствует более быстрому развитию дистрофического процесса в печени [1].

Проводили оценку физиологического состояния животных: внешний вид, поведение, поедание корма, изменение массы тела. Функциональное состояние печени оценивали по изменению активности ферментов (АЛТ, АСТ, ЩФ) и содержания в сыворотке крови общего и прямого билирубина, в тесте

«тиопенталовый сон». Определение биохимических показателей проводили на 15-й день эксперимента на биохимическом анализаторе Sapfir-400 с использованием реактивов фирмы Diasys. Для теста «тиопенталовый сон» крысам внутривенно вводили 20%-ный раствор тиопентала натрия и помещали каждую крысу в отдельную клетку. Отмечали время засыпания и длительность сна в минутах. После выведения всех животных из эксперимента проводили морфологические исследования: плотность, цвет, эластичность печени, состояние ее переднего края, взвешивание органа для подсчета весового индекса (отношение массы печени к массе тела). Из образцов печени готовили гистологические препараты, окрашивали гематоксилином и эозином. Для оценки степени выраженности паренхиматозной дистрофии, стромально-сосудистых изменений, изменений архитектоники печени использовали полуколичественную систему оценки в баллах: 1 – слабо выраженные изменения; 2 – умеренно выраженные изменения; 3 – выраженные изменения. Статистическую обработку данных проводили с использованием методов вариационной статистики. Достоверность различий между средними величинами определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Со второго-третьего дня введения комплекса ПТП у крыс отмечалось угнетение двигательной активности и поедания корма, особенно у самцов. К концу эксперимента потеря массы у самцов была существенной и составила $4,04 \pm 0,53\%$ по сравнению с исходной массой. У самок только у 3 из 8 особей снижение массы составляло в среднем 2,2%. Средняя потеря массы у контрольных крыс, также находящихся на низкобелковой диете, была менее 1%.

Антиоксидантную функцию печени тестировали в опытах с тиопенталовым сном. Продолжительность тиопенталового сна также можно рассматривать как интегральный тест, позволяющий оценить состояние микросомального окисления и выделить фенотипы «быстрых и медленных метаболизаторов». Ранее при использовании с этой целью гексенала в группу «быстрых метаболизаторов» были отнесены крысы со временем гексеналового сна не более 15 мин, к «медленным метаболизаторам» – животные со временем гексеналового сна более 27 мин [5]. При использовании тиопентала натрия для проведения данного теста установлено, что по времени засыпания и продолжительности сна у контрольных самцов и самок различия недостоверны, что позволяет их отнести к одной фенотипической группе по активности монооксигеназ (табл. 1). Длительность сна у крыс, получавших комплекс ПТП, достоверно больше, чем у контрольных животных, что свидетельствует о существенном снижении антиоксидантной функции печени. Однако по сравнению с контрольными крысами, у самок, получавших ПТП,

Таблица 1. Параметры тиопенталового сна у самок и самцов в контрольных и опытных группах**Table 1.** Parameters of thiopental sleep in males and females in control and experimental groups

Группа крыс	Время засыпания, мин	Длительность сна, мин
Самки, контроль	10,13 ± 1,50	9,40 ± 2,04
		$p < 0,01$
Самки, ПТП	13,00 ± 3,24	67,43 ± 2,25
Самцы, контроль	7,44 ± 1,07	11,63 ± 3,19
		$p < 0,01$
Самцы, ПТП	8,29 ± 3,81	49,8 ± 9,9

Таблица 2. Биохимические показатели крови крыс опытных и контрольных групп**Table 2.** Blood biochemical parameters of rats in experimental and control groups

Показатели	Самки, контроль	Самки, ПТП	Самцы, контроль	Самцы, ПТП
АЛТ, ед/л	44,90 ± 2,63	61,36 ± 4,43*	77,30 ± 4,87	93,76 ± 5,85*
АСТ, ед/л	198,16 ± 12,52	218,90 ± 17,56	214,24 ± 13,21	282,99 ± 26,10*
Билирубин общий, мкмоль/л	3,76 ± 0,45	5,68 ± 0,30**	2,42 ± 0,11	5,06 ± 0,39**
Билирубин прямой, мкмоль/л	1,71 ± 0,42	1,73 ± 0,21	1,08 ± 0,08	4,43 ± 0,44**
ЩФ, ед/л	244,67 ± 32,90	348,25 ± 28,69*	518,5 ± 44,5	743,0 ± 77,3*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем

значения показателя у животных в опытной группе от такового в контрольной, рассчитывали по формуле и выражали в процентах:

$$K = \frac{(CP_{\text{опыт}} - CP_{\text{контроль}})}{CP_{\text{контроль}}} \times 100 (\%), \text{ где}$$

CP – среднее значение показателя в группе опыт или группе контроль.

Результаты расчетов коэффициентов представлены в табл. 3.

Таблица 3. Коэффициенты отклонений биохимических показателей крови крыс из опытных и контрольных групп между быстрыми (самки) и медленными (самцы) ацетиляторами изониазида**Table 3.** Coefficients of abnormalities of blood biochemical parameters in rats from experimental and control groups between fast (females) and slow (males) isoniazid acetylators

Показатель	Коэффициенты отклонения (%)	
	самки	самцы
АЛТ	36,6	21,3
АСТ	10,5	32,1
Билирубин общий	51,1	109,1
Билирубин прямой	1,17	310,2
ЩФ	42,3	43,3

Результаты свидетельствуют, что активность АЛТ в большей степени повышается у быстрых ацетиляторов, чем у медленных (36,6 и 21,3%, в 1,7 раза выше). Активность АСТ и содержание билирубинов возрастает у медленных ацетиляторов в большей мере, чем у быстрых, особенно значительно (310,2 и 1,17%, в 265 раз) прямого билирубина.

продолжительность сна в 7 раз больше, а у самцов – в 4 раза, что, очевидно, обусловлено влиянием фенотипических особенностей по линии активности N-ацетилтрансферазы.

Биохимические исследования крови крыс представлены в табл. 2.

У самок опытной группы повысилась активность ферментов АЛТ и ЩФ и содержание общего билирубина, у самцов – все показатели относительно контрольных групп. В целях сравнения значимости изменения каждого из биохимических показателей между быстрыми и медленными ацетиляторами определяли коэффициент (K) отклонения среднего

При вскрытии самок из опытной группы отмечали полнокровие печени, снижение эластичности и незначительное изменение окраски (слабый желтоватый оттенок). Весовой индекс печени у самок опытной группы ($4,13 \pm 0,11$) был выше, чем у животных в контроле ($3,37 \pm 0,09$; $p < 0,01$). У самцов опытной группы также отмечали снижение эластичности печени и появление желтоватого оттенка. По весовому индексу печени ($3,14 \pm 0,09$) достоверных различий с контролем ($2,81 \pm 0,23$) не отмечалось.

В гистологических препаратах по сравнению с печенью контрольных крыс в печени крыс опытных групп выявлены патологические изменения разной степени выраженности (рис. 1, 2).

Так, в печени крыс-самок, получавших ПТП, отмечались дисконфлексация печеночных балок, выраженное венозное полнокровие, выраженный отек портальных трактов, стаз эритроцитов в микроциркуляторном русле, выраженная или умеренно выраженная гидропическая дистрофия с наличием (или без) некроза отдельных гепатоцитов (рис. 1).

В гистологических препаратах печени крыс-самцов выявлены: умеренное венозное полнокровие, слабо выраженный отек портальных трактов, мононуклеарная инфильтрация единичных в препарате портальных трактов, очаговая умеренно выраженная гидропическая дистрофия гепатоцитов (рис. 2).

При сравнении изменений в тканях печени у самок и самцов опытных групп с использованием полуколичественной морфометрии установлено преобладание выраженного компонента стромально-сосудистых изменений у самок на фоне парен-

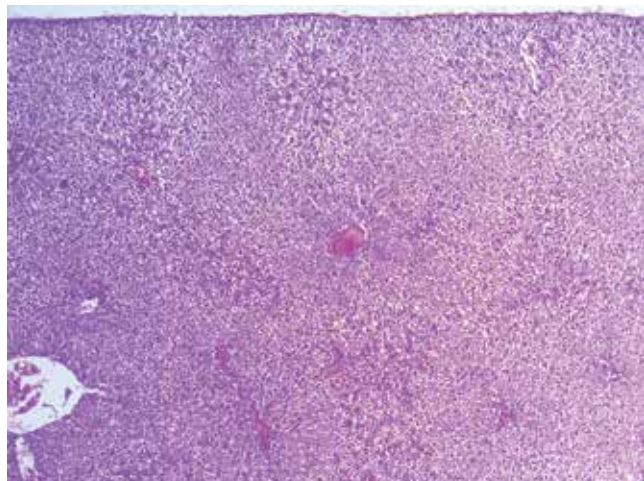


Рис. 1. Препарат печени крысы-самки из опытной группы. Выраженная гидропическая дистрофия гепатоцитов, стертость границ печеночных долек, дискомплексація печеночных балок. Выраженное венозное полнокровие. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$

Fig. 1. A specimen of the liver of a female rat from the experimental group. Severe hydropic degeneration of hepatocytes, blurring of the borders of the hepatic lobules, discomplexation of the hepatic tracts. Pronounced venous congestion. Hematoxylin-eosin staining, $\times 40$

химатозных изменений, степень выраженности которых недостоверно выше, чем у самцов (табл. 4).

Таблица 4. Показатели полуколичественной морфометрии печени у крыс опытных групп

Table 4. Parameters of semi-quantitative liver morphometry in rats of experimental groups

Показатели (баллы)	Самки, ПТП	Самцы, ПТП
Суммарный индекс морфологических изменений печени	18,0 \pm 1,5	12,67 \pm 3,42
Степень выраженности паренхиматозных изменений	2,88 \pm 0,32	2,33 \pm 0,69
Степень выраженности стромально-сосудистых изменений печени	5,63 \pm 0,57	3,22 \pm 0,66*

Заключение

Ежедневное применение в течение 14 дней комплекса ПТП с включением изониазида и рифампицина приводит к нарушению функционального состояния и морфологическим изменениям печени крыс. С учетом фенотипических особенностей метаболизма препаратов у крыс-самок (быстрые

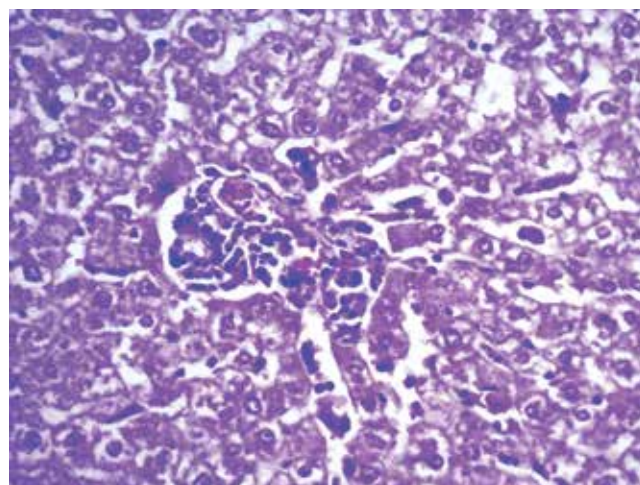


Рис. 2. Препарат печени крысы-самца из опытной группы. Мелкоочаговая мононуклеарная инфильтрация портальных трактов. Выраженная гидропическая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 2. A specimen of the liver of a male rat from the experimental group. Small focal mononuclear infiltration of the portal tracts. Severe hydropic degeneration of hepatocytes. Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$

ацетиляторы изониазида) преобладали признаки цитолитического механизма повреждения печени (более значимое повышение активности АЛТ, выраженная длительность тиопенталового сна, выраженная гидропическая дистрофия гепатоцитов с наличием некроза гепатоцитов, венозное полнокровие и отек портальных трактов). У крыс-самцов (медленные ацетиляторы изониазида) установлено значительное повышение содержания билирубинов, активности АСТ и в меньшей степени АЛТ, то есть это признаки смешанного механизма повреждения печени (холестатического и цитолитического). Соответственно полученным различиям по формированию повреждения печени, связанному с применением изониазида в комплексе с ПТП, где ведущим моментом является фенотипическая особенность скорости ацетилирования и образования токсичных метаболитов, необходимо подбирать гепатопротекторы, направленные на защиту гепатоцитов и усиление антитоксической функции печени.

Для профилактики ГТР у впервые выявленных больных туберкулезом, которые будут получать лечение по 1-му режиму химиотерапии, важно проводить определение генотипа по всем ферментам метаболизма ПТП.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аюшеева Л. Б. Полифитохол - новый гепатопротектор в клинике туберкулеза: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 1998. - 21 с.
2. Ванюков М. М. Исследование изменчивости ацетиляторных фенотипов крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - М., 1984. - 21 с.
3. Иванова Д. А., Борисов С. Е. Спектр и факторы риска нежелательных побочных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом // Туб. и болезни легких. - 2017. - № 6. - С. 46-52.
4. Казаков А. В., Можоккина Г. Н., Аксенова В. А., Смердин С. В., Попов С. А., Клевно Н. И., Рагимов А. А., Кузнецов О. Е., Козлов В. В. Влияние генетического полиморфизма генов ферментов, ответственных за биотрансформацию противотуберкулезных препаратов, на риск развития гепатотоксических реакций у больных туберкулезом // Антибиотики и химиотерпия. - 2018. - № 5-6. - С. 20-25.
5. Мишарина М. Е., Сейликман В. Э., Сейликман О. Б., Лапшин М. С. и др. Содержание продуктов липопероксидации в коре головного мозга у крыс с различными фенотипами микросомального окисления при введении экзогенного глюкокортикоида // Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования». - 2013. - № 5.
6. Старшинова А. А., Беляева Е. Н., Пантелеев А. М., Павлова М. В. Применение гепатопротекторов на фоне химиотерапии туберкулеза: обзор отечественных и зарубежных исследований // Туб. и болезни легких. - 2018. - Т. 96, № 10. - С. 63-69.
7. Соколова Г. Б. Индивидуализированная химиотерапия туберкулеза легких (экспериментально-клиническое исследование): Дис. ... д. м. н. в виде научного доклада. - М., 2000.

REFERENCES

1. Ayusheeva L.B. *Polifitokhol - novy gepatoprotektor v klinike tuberkuleza. Avtoref. diss. kand. med. nauk.* [Polyphytochole - a new hepatoprotector in the treatment of tuberculosis. Synopsis of Cand. Diss.]. Moscow, 1998. 21 p.
2. Vanyukov M.M. *Issledovanie izmenchivosti atsetilyatornykh fenotipov krys. Avtoref. diss. kand. biol. nauk.* [Study of acetylizing phenotypes of rats. Synopsis of Cand. Diss.]. Moscow, 1984. 21 p.
3. Ivanova D.A., Borisov S.E. Profile and risk factors of adverse reactions in new tuberculosis cases receiving treatment. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, no. 6, pp. 46-52. (In Russ.)
4. Kazakov A.V., Mozhokina G.N., Aksenova V.A., Smerdin S.V., Popov S.A., Klevno N.I., Ragimov A.A., Kuznetsov O.E., Kozlov V.V. The impact of genetic polymorphism of the enzyme genes responsible for biotransformation of anti-tuberculosis drugs on the risk of hepatotoxic reactions in tuberculosis patients. *Antibiotiki i Khimioterapiya*, 2018, no. 5-6. (In Russ.) pp. 20-25. (In Russ.)
5. Misharina M.E., Tseylikman V.E., Tseylikman O.B., Lapshin M.S. et al. The content of lipid peroxidation products in the cerebral cortex in rats with different phenotypes of microsomal oxidation upon administration of an exogenous glucocorticoid. *Elektronny Nauchny Zhurnal Sovremnyye Problemy Nauki i Obrazovaniya*, 2013, no. 5. (In Russ.)
6. Starshinova A.A., Belyaeva E.N., Panteleev A.M., Pavlova M.V. Use of hepatoprotectors during tuberculosis chemotherapy: review of the Russian and international studies. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2018, vol. 96, no. 10, pp. 63-69. (In Russ.)
7. Sokolova G.B. *Individualizirovannaya khimioterapiya tuberkuleza legkikh (eksperimentalno-klinicheskoe issledovanie). Dis. d. m. n. v vide nauchnogo doklada.* [Personalized chemotherapy of pulmonary tuberculosis (an experimental clinical study). A presentation of Doct. Diss.]. Moscow, 2000.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний»,
127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4.

Можоккина Галина Николаевна

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории инфекционной иммунологии,
патологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (495) 688-41-85.
E-mail: mojokina@mail.ru

Казаков Алексей Владимирович

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник
отдела туберкулеза у детей и подростков.
E-mail: alexeykazakov1982@yandex.ru

Зюзя Юлия Рашидовна

кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом.
E-mail: zuzaju@mail.ru

Петрова Лариса Юрьевна

кандидат медицинских наук, врач лабораторий
клинической лабораторной диагностики.
Тел.: 8 (495) 681-08-72.
E-mail: Petrova-kld@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology
and Infectious Diseases,
4, Dostoevsky St.,
Moscow, 127473

Galina N. Mozhokina

Doctor of Medical Sciences,
Leading Researcher of Laboratory for Infectious Immunology,
Pathology and Biotechnology.
Phone: +7 (495) 688-41-85.
Email: mojokina@mail.ru

Aleksey V. Kazakov

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of Children
and Adolescent Tuberculosis Department.
Email: alexeykazakov1982@yandex.ru

Yuliya R. Zyuzya

Candidate of Medical Sciences, Morbid Anatomist.
Email: zuzaju@mail.ru

Larisa Yu. Petrova

Candidate of Medical Sciences,
Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics Department.
Phone: +7 (495) 681-08-72.
Email: Petrova-kld@mail.ru

Поступила 6.06.2019

Submitted as of 6.06.2019