

А.Е. Антушевич¹, В.А. Башарин¹,
В.Л. Рейнюк², П.А. Бугаев¹

Эффективность инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия и пиридоксина гидрохлорида при остром отравлении несимметричным диметилгидразином

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Резюме. Исследована эффективность пиридоксина гидрохлорида и инозина глицил-цистеинил-глутамата динатрия (моликсана) в монотерапии, а также в их комбинации при остром отравлении несимметричным диметилгидразином по выживаемости, биохимическим показателям крови и состоянию плазменно-коагуляционного гемостаза. Несимметричный диметилгидразин вводили внутривенно в дозе 115 мг/кг (ЛД₅₀) однократно. Исследуемые препараты также вводили внутривенно: пиридоксина гидрохлорид – в дозе 50 мг/кг однократно через 30 минут после введения несимметричного диметилгидразина, инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (моликсан) – в дозе 60 мг/кг семикратно: через 30 минут после введения несимметричного диметилгидразина, затем ежедневно в течение 6 суток. Биохимические показатели крови, плазменно-коагуляционный гемостаз оценивали через 7 суток после введения несимметричного диметилгидразина. Установлено, что применение пиридоксина как в монотерапии, так и в комбинации с моликсаном предотвращает гибель экспериментальных животных и развитие у них судорожного синдрома. Кроме того, комбинация моликсана с пиридоксином устраняет развитие токсических поражений печени, то есть оказывает гепатозащитное действие. Эффективность моликсана как гепатопротектора, по-видимому, связана с тем, что по своей структуре он является комбинированным препаратом, содержащим пептидный и пуриновый компоненты. Пептидный компонент (глицил-цистеинил-глутамат динатрия) является фармакологическим аналогом окисленного глутатиона, пуриновый – представлен инозином. Окисленный глутатион обладает цитопротекторной активностью, ингибирует цитолиз гепатоцитов, уменьшает выраженность воспалительного процесса при токсическом поражении клеток печени продуктами метаболизма ксенобиотиков. Инозин также обладает гепатопротекторными свойствами. Являясь предшественником синтеза аденозинтрифосфорной кислоты и нуклеотидов, он стимулирует ряд метаболических процессов в организме, поддерживает энергетический баланс в различных тканях, особенно в печени и миокарде.

Ключевые слова: несимметричный диметилгидразин, острая токсичность, моликсан, пиридоксин, токсический гепатит, гепатозащитное действие, выживаемость, судорожный синдром, биохимический анализ крови, плазменно-коагуляционный гемостаз.

Введение. 1,1-диметилгидразин (несимметричный диметилгидразин – НДМГ, гептил) в настоящее время используется в качестве ракетного топлива (гидразиновые горючие): на отечественных ракетах-носителях (РН) «Космос», «Циклон», «Протон»; американских — семейства «Титан»; французских – семейства «Ариан»; японских – семейства «N»; китайских – семейства «Большой поход»; в двигательных установках пилотируемых кораблей и автоматических спутников, орбитальных и межпланетных станций, многоразовых космических кораблей «Буран» и «Спейс шаттл». Гидразиновые горючие энергетически более эффективны по сравнению с углеводородными [3].

НДМГ – бесцветная или слегка желтоватая прозрачная жидкость с резким неприятным запахом, характерным для аминов. НДМГ относится к 1-му классу опасности. Основными проявлениями резорбтивного действия НДМГ при остром отравлении являются симптомы поражения центральной нервной системы (ЦНС), крови, печени и почек [5].

Наиболее эффективным антидотом при отравлении НДМГ является пиридоксин (витамин В₆). Пиридоксин входит в перечень рекомендованных

антидотных средств, утверждённый приказом Минздрава Российской Федерации (РФ) от 08.01.2002 г. №9 [7] и Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2018 г., утверждённый распоряжением Правительства РФ от 23.10.2017 года № 2323-р [8]. Этот препарат успешно действует на основной механизм токсического действия НДМГ, купирует нарушения со стороны ЦНС, в том числе судорожный синдром. Однако механизм гепатотоксического действия НДМГ, вероятнее всего, связан с усилением перекисного окисления в тканях печени, генерацией в ней карбокатионов, алкильных радикалов и активных форм кислорода [5]. В этой связи для обеспечения оптимального терапевтического эффекта необходимо применение гепатопротекторов наряду с традиционной антидотной терапией пиридоксином.

Одним из таких гепатозащитных средств может быть моликсан, представляющий собой органическую соль, включающую инозин (пуриновая компонента) и глицил-цистеинил-глутамат динатрия (пептидная компонента). А.Н. Гребенюк и др. [1] указывают на его эффективность как средства лечения хронических вирусных гепатитов В и С, а также при острых алкогольных отравлениях.

Цель исследования. Сравнить эффективность применения пиридоксина гидрохлорида и моликсана в монотерапии, а также в их комбинации при остром отравлении НДМГ.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 90 беспородных белых крысах-самцах из питомника Российской академии медицинских наук «Рапполово». Животных содержали в условиях вивария, не более 6 особей в одной клетке при свободном доступе к воде и пище, за сутки до эксперимента кормление не производилось. Содержание, питание, уход и выведение из эксперимента соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утверждённым приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. [6].

НДМГ, разведённый 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:19, вводили животным внутривенно в дозе 115 мг/кг (LD_{50}) однократно. В качестве лечебных средств применяли пиридоксина гидрохлорид (официальный раствор для инъекций 50 мг/мл в ампулах по 1 мл) и моликсан (официальный раствор для внутривенного и внутримышечного введения 30 мг/мл в ампулах по 2 мл). Пиридоксина гидрохлорид вводили внутривенно в дозе 50 мг/кг однократно через 30 минут после введения НДМГ, а моликсан – внутривенно в дозе 60 мг/кг семикратно: через 30 минут после введения НДМГ, затем ежедневно в течение 6 суток после отравления.

Животные были разделены на 5 групп по 18 особей в каждой: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – контрольная (НДМГ без фармакологической коррекции); 3-я группа – НДМГ + пиридоксин; 4-я группа – НДМГ + моликсан; 5-я группа – НДМГ + пиридоксин + моликсан.

У экспериментальных животных оценивали биохимические показатели крови и состояние плазменно-коагуляционного гемостаза. Для этого кровь отбирали после декапитации. Исследование проводили через 7 суток после введения НДМГ и начала терапии, для сравнения во всех случаях использовали показатели интактной группы. Кроме того, для уточнения степени нарушения синтетической функции гепатоцитов и выраженности синдрома печеночной недостаточности также исследовали показатели свёртывающей системы и определяли концентрацию метаболитически активных веществ, синтезируемых клетками печени.

Исследование плазмы крови выполняли на биохимическом анализаторе «Mindray BS-120» (Китай). Определяли концентрацию аспаратаминотрансферазы (АСТ), конинаминотрансферазы (АЛТ), общего белка, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ), глюкозы, креатинина, амилазы, билирубина, мочевины, общего холестерина.

Оценку состояния плазменно-коагуляционного гемостаза проводили на анализаторе «АПГ2-02-П» (Россия). Определяли следующие показатели: частичное (активированное) тромбoplastиновое время (АПТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновый индекс

(ПТИ), протромбиновое отношение (ПО), % содержание протромбина по Квику, содержание фибриногена и международное нормализованное отношение (МНО).

Выживаемость животных и эффективность применения исследуемых препаратов при отравлении НДМГ проводили с применением пробит-анализа (по Финни) с использованием программы Statistica+ 2005 для Windows. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Среднюю ошибку альтернативных показателей (приблизительное значение) определяли с помощью таблицы Генеса. Расчет доверительного интервала альтернативных показателей проводили с использованием поправки Йетса для малых выборок и применением вспомогательной переменной Фишера. Для оценки значимости межгрупповых различий альтернативных показателей применяли χ^2 -критерий Пирсона и точный метод Фишера.

Результаты и их обсуждение. Введение НДМГ вызвало судорожный синдром у отравленных животных, который полностью купировался применением пиридоксина. Введение пиридоксина положительно влияло на выживаемость крыс, которая в экспериментальных группах составила 100%, во 2-й группе – 50%. Аналогичный эффект отмечался и при комбинированном применении пиридоксина с моликсаном. Введение только моликсана не оказывало значимого влияния на выживаемость отравленных животных по сравнению со 2-й группой (табл. 1).

Во 2-й группе активность щелочной фосфатазы через 7 дней после отравления НДМГ в дозе LD_{50} составила $457,3 \pm 57,9$ ед/л против $274,5 \pm 20,5$ ед/л в 1-й группе, АСТ – $269,44 \pm 20,6$ ед/л против $201,8 \pm 15,7$ ед/л, концентрация общего билирубина – $4,35 \pm 0,8$ мкмоль/л против $1,8 \pm 0,06$ мкмоль/л соответственно (табл. 2). Повышение активности щелочной фосфатазы и концентрации общего билирубина рассматриваются как лабораторные маркеры холестаза и могут свидетельствовать о нарушении связывания билирубина глюкурономидом в результате снижения количества гепатоцитов. Повышение активности АСТ является проявлением цитолитического синдрома в печени.

Таким образом, у животных 5-й группы не отмечалось значимых изменений по вышеперечисленным показателям в сравнении с 1-й группой. Повышение уровня АСТ более характерно для воспалительных за-

Таблица 1
Влияние пиридоксина и моликсана на выживаемость крыс при острой крайне тяжёлой интоксикации НДМГ в дозе LD_{50} при 3-суточном наблюдении, абс. число (%), $M \pm m_x$

Группа	Погибли
1-я	0 (0+6)*
2-я	9 (50±)
3-я	0 (0+6)*
4-я	8 (44±)
5-я	0 (0+6)*

Примечание: * – различия по сравнению со 2-й группой, $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние пиридоксина и моликсана на биохимические показатели крови у крыс через 7 дней после отравления НДМГ в дозе 115 мг/кг, $M \pm m_x$

Показатель	Группа		
	1-я	2-я	5-я
Общий белок, г/л	56,3±1,61	51,54±1,59	57,1±2,15
Креатинин, мкмоль/л	37±1,23	40,3±1,11	36,8±1,37
Щелочная фосфатаза, ед/л	274,5±20,51	457,3±57,9*	272,4±19,61#
Глобулин, г/л	23,5±1,79	28,8±1,99	23,9±1,81
Альбумин, г/л	34,5±0,95	32,8±1,1	35,3±0,92
Мочевина, ммоль/л	4,7±0,51	5,2±0,42	4,6±0,49
АСТ, ед/л	201,8±15,70	269,44±20,6*	203,4±15,23#
АЛТ, ед/л	142±4,96	146,44±12,37	141,54±4,83
ГГТП, ед/л	4,6±0,31	3,67±0,37	4,59±0,42
Общий билирубин, мкмоль/л	1,8±0,06	4,35±0,8*	1,93±0,05#

Примечание: * – различия по сравнению с 1-й группой; # – по сравнению со 2-й группой, $p \leq 0,05$.

болеваний печени в острый период или при рецидиве хронического воспалительного процесса. Увеличение активности фермента, как правило, сочетается с увеличением активности АЛТ, а при остром и хроническом гепатитах, особенно на ранних стадиях, отношение АСТ/АЛТ (коэффициент де Ритиса) меньше 1. В случае тяжелого поражения печени (токсический гепатит, цирроз) нередко наблюдается другое соотношение активности ферментов, а активность АСТ оказывается выше, чем АЛТ (коэффициент де Ритиса больше 1,5). Такое соотношение было отмечено у крыс 2-й группы. Коэффициент де Ритиса у них составил 1,84 против 1,42 у животных 1-й группы и 1,44 у животных 5-й группы. Если учитывать, что показатели активности АЛТ и АСТ в плазме крови крыс 5-й группы значимо не отличались от таковых 1-й группы, то это свидетельствует о гепатозащитном эффекте комбинации моликсана с пиридоксином.

Действие НДМГ на свёртывающую систему крови проявляется развитием гипокоагуляционного синдрома. Это подтверждается достоверным снижением ПТИ с 78,9±2,34% в 1-й группе до 67,6±3,63% ($p \leq 0,05$) во 2-й и повышением МНО с 1,3±0,05 до 1,6±0,08 ($p \leq 0,01$), таблица 3.

Выявленные изменения могли быть следствием снижения содержания в плазме крови протромбина, на что косвенно указывает содержание протромбина по Квику (71,8±2,60% в 1-й группе против 54,4±1,56% во 2-й). Если учитывать, что протромбин синтезируется в печени и его уровень в плазме крови напрямую зависит от функционального состояния органа, то полученные величины коагулограммы подтверждают предположение о формировании у животных 2-й группы нарушения синтетической функции печени. У животных 5-й группы функция печени была сохранена, о чём свидетельствует отсутствие значимых различий в исследуемых показателях у крыс 5-й и 1-й групп.

Таким образом, наилучший эффект отмечен при применении комбинации пиридоксина с моликсаном. Ведущим механизмом нейротоксического действия производных гидразина считается блокада ферментов, кофактором которых является пиридоксальфосфат – производное пиридоксина, что сопровождается истощением депо гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и подавлением тормозных процессов в ЦНС [4, 9]. Пиридоксин является биохимическим антагонистом НДМГ. Он восстанавливает активность пиридоксалькиназы,

Таблица 3

Показатели, характеризующие состояние свертывающей системы крови у крыс через 7 дней после введения НДМГ в дозе 115 мг/кг, $M \pm m_x$

Показатель	Группа		
	1-я	2-я	5-я
АЧТВ, с	18,8±1,55	18,3±0,74	18,7±1,42
Время свертывания, с	22,1±0,70	24,0±0,98	22,3±0,65
ПТИ, %	78,9±2,34	67,6±3,63*	78,7±1,96#
ПО, у. е.	1,3±0,04	1,4±0,07	1,3±0,03
МНО, у. е.	1,3±0,05	1,6±0,08**	1,3±0,04##
Протромбин по Квику, %	71,8±2,60	54,4±1,56**	70,7±1,98##
Фибриноген, г/л	0,6±0,03	0,6±0,02	0,6±0,03

Примечание: * – различия по сравнению с 1-й группой, $p \leq 0,05$; ** – то же, $p \leq 0,01$; # – по сравнению со 2-й группой, $p \leq 0,05$; ## – то же, $p \leq 0,01$.

вытесняя пиридоксальгидразоны из связи с её активным центром, вследствие чего происходит нормализация процесса синтеза пиридоксальфосфата и восстанавливается активность пиридоксальфосфатзависимых энзимов [4]. В связи с этим пиридоксин эффективно устраняет основные проявления интоксикации.

Эффективность моликсана как гепатопротектора, по-видимому, связана с тем, что по своей структуре он является комбинированным препаратом, содержащим пептидный и пуриновый компоненты. Пептидный компонент представляет собой глицил-цистеинил-глутамат динатрия (фармакологический аналог окисленного глутатиона), а пуриновый представлен инозином. Окисленный глутатион обладает цитопротекторной активностью, ингибирует цитолиз гепатоцитов, уменьшает выраженность воспалительного процесса при токсическом поражении клеток печени продуктами метаболизма ксенобиотиков [10]. Кроме того, пептидная составляющая моликсана опосредованно влияет на метаболизм ксенобиотиков, процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток печени, способствуя восстановлению нормальной структуры печеночной ткани. Инозин, являясь предшественником синтеза аденозинтрифосфорной кислоты и нуклеотидов, стимулирует ряд метаболических процессов в организме, поддерживает энергетический баланс в различных тканях, особенно в печени и миокарде, обладает гепатопротекторными, противовоспалительными, нейропротекторными и антигипоксическими свойствами [2]. Эти свойства моликсана могут прямо влиять на течение и исход острой крайне тяжёлой интоксикации несимметричным диметилгидразином.

Выводы

1. Применение пиридоксина в монотерапии, а также комбинации пиридоксина с моликсаном при интоксикациях, вызванных НДМГ в дозе ЛД₅₀, предотвращает развитие судорог и гибель отравленных крыс.

2. Комбинация моликсана с пиридоксином при интоксикациях, вызванных НДМГ в дозе ЛД₅₀, оказывает гепатозащитное действие.

Литература

1. Гребенюк, А.Н. Эффективность нейропептида и гепатопротекторов пептидной и непептидной природы в терапии острых крайне тяжелых отравлений этиловым спиртом / А.Н. Гребенюк [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2014. – № 1 (45). – С. 136–141.
2. Гудков, С.В. Использование рибоксина (инозина) после рентгеновского облучения для защиты клеток крови мышей / С.В. Гудков [и др.] // Нижегородский мед. журн. – 2008. – № 4. – С. 18–24.
3. Иванова, Л.А. Влияние ракетного топлива на организм человека на объектах его использования, хранения и утилизации / Л.А. Иванова // Россия молодая – передовые технологии в промышленности. – 2015. – № 3. – С. 153–158.
4. Куценко, С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб: Фолиант, 2004. – 720 с.
5. Лавриненко, И.А. 1, 1 – диметилгидразин: мутагенные и общетоксические свойства / И.А. Лавриненко, В.А. Лавриненко // Вестн. Новосибир. гос. ун-та. Серия: биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 229–236.
6. О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных: приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755. – М., 1977. – 22 с.
7. О мерах по совершенствованию организации токсикологической помощи населению Российской Федерации: приказ Минздрава РФ от 08.01.2002 г. № 9. – М., 2002. – 19 с.
8. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2018 год, а также перечней лекарственных препаратов для медицинского применения и минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи: распоряжение Правительства РФ от 23.10.2017 г. № 2323-р // Собрание законодательства Российской Федерации. – 2017. – № 44. – С. 18981–19070.
9. Сарманаев, С.Х. Медицинское обеспечение безопасности работы с компонентами ракетного топлива / С.Х. Сарманаев, И.Р. Ахметов, А.И. Болотников // Амурский мед. журн. – 2014. – № 3 (7). – С. 21–24.
10. Свиридов, М.М. Каталитические свойства 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите / М.М. Свиридов, А.В. Семенихина, Т.Н. Попова // Биомед. химия. – 2006. – № 52 (5). – С. 479–488.

A.E. Antushevich, V.A. Basharin, V.L. Reynyuk, P.A. Bugaev

Efficiency of inosine glycyL-cysteinyl-glutamate disodium and pyridoxine in acute poisoning by unsymmetrical dimethylhydrazine

Abstract. Effectiveness of pyridoxine hydrochloride and inosine glycyL-cysteinyl-glutamate dinatrium (molixan) in monotherapy and in combination in acute poisoning by unsymmetrical dimethylhydrazine on survival, blood biochemical indicators and the state of plasma coagulation hemostasis was assessed. Unsymmetrical dimethylhydrazine was administered intraperitoneally at a dose of 115 mg/kg (LD₅₀) once. Drugs under examination were also administered intraperitoneally: pyridoxine hydrochloride in a dose of 50 mg/kg once, 30 minutes after the administration of unsymmetrical dimethylhydrazine, the inosine glycyL-cysteinyl-glutamate dinatrium (molixan) in a dose of 60 mg/kg seven times: 30 minutes after the administration of unsymmetrical dimethylhydrazine, and then daily for 6 days. Biochemical parameters of blood, plasma coagulation hemostasis, were evaluated 7 days after the administration of unsymmetrical dimethylhydrazine. The use of pyridoxine as a monotherapy and in combination with molixan prevents death of experimental animals and the development of convulsive syndrome. In addition, the combination of molixan with pyridoxine eliminates the development of toxic lesions of liver that is having hepatoprotective effect. The efficiency of molixan as hepatoprotector, apparently, related to the fact that in its structure it is a combined preparation containing the peptide and purine components. The peptide component (glycyL-cysteinyl-glutamate dinatrium) is a pharmacological analogue of oxidized glutathione, purine is represented by inosine. Oxidized glutathione has cytoprotective activity, inhibits the cytolysis of hepatocytes, and reduces the severity of inflammatory process during toxic damage of liver cells by the products of metabolism of xenobiotics. Inosine also has hepatoprotective properties. As a precursor to the synthesis of adenosine triphosphoric acid and nucleotides, it stimulates a number of metabolic processes in body, supports energy balance in various tissues, particularly in liver and myocardium.

Key words: unsymmetrical dimethylhydrazine, acute toxicity, molixan, pyridoxine, toxic hepatitis, hepatoprotective action, survival, convulsions, the biochemical analysis of blood, plasma coagulation hemostasis.

Контактный телефон: 8-911-235-81-25; e-mail: petr-bugaev@mail.ru