

ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОГО СПІВВІДНОШЕННЯ ДОЗИ ІЗОНІАЗИДУ ТА ВІТАМІНУ В₆ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ У МОРСЬКИХ СВИНОК

Л.В. Гайова¹, А.І. Барбова², П.С. Трофімова², Л.С. Бобкова³, А.В. Чубенко³

¹ Національний медичний університет, Київ

² Інститут фізіатрії і пульмонології, Київ

³ Інститут фармакології та токсикології, Київ

Резюме. За результатами спеціально спланованого факторного експерименту — лікування експериментального туберкульозу у морських свинок різними дозами ізоніазиду та вітаміну В₆ — побудована математична модель, яка описує цей процес. Ступінь захворюваності туберкульозом оцінювали за індексом ураженості внутрішніх органів тварин. В якості факторів, які впливають на значення індексу ураженості, використовували ізоніазид (перший фактор) та вітамін В₆ (другий фактор). Вплив кожного фактору вивчали на трьох рівнях дози. На основі побудованої математичної моделі визначили оптимальне співвідношення доз ізоніазиду та вітаміну В₆, яке складає 10 та 26 мг/кг, відповідно.

Ключові слова: туберкульоз, *M. tuberculosis*, ізоніазид, вітамін В₆.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СООТНОШЕНИЯ ДОЗЫ ИЗОНИАЗИДА И ВИТАМИНА В₆ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА У МОРСКИХ СВИНОК

Л.В. Гаевая, А.И. Барбова, П.С. Трофимова, Л.С. Бобкова, А.В. Чубенко

Резюме. По результатам специально спланированного факторного эксперимента — лечения экспериментального туберкулеза у морских свинок различными дозами изониазида и витамина В₆ — построена математическая модель, которая описывает этот процесс. Степень заболевания туберкулезом оценивали по индексу поражения внутренних органов животных. В качестве факторов, которые влияют на значение индекса поражения, использовали изониазид (первый фактор) и витамин В₆ (второй фактор). Влияние каждого фактора изучали на трех уровнях дозы. На основе построенной математической модели определили оптимальное соотношение доз изониазида и витамина В₆, которое составляет 10 и 26 мг/кг, соответственно.

Ключевые слова: туберкулез, *M. tuberculosis*, изониазид, витамин В₆.

DETERMINATION OF THE OPTIMUM RATIO OF ISO- NIAZID AND VITAMIN В₆ FOR TREATMENT OF GUINEA-PIGS IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

L.V. Gaevaya, A.I. Barbova, P. S. Trofimova, L.S. Bobkova, A.V. Chubenko

Summary. With the help of specially planned factorial experiment — treatment of guinea-pigs with an experimental tuberculosis by various doses of isoniazid and vitamin В₆, the mathematical model which describes this process is constructed. Severity of tuberculosis value by index of affection of internal organs of guinea-pigs. As factors which influence on index of affection were used: isoniazid as a first factor and vitamin В₆ as a the second factor. Each factor was studied at three levels of doses. On the basis of the constructed mathematical model the optimum ratio between doses of isoniazid and vitamin В₆ which average 10 and 26 mg/kg has been determined.

Key words: tuberculosis, *M. tuberculosis*, isoniazid, vitamin В₆.

Адреса для листування:

Гайова Людмила Володимирівна

03057, м. Київ, пр. Перемоги, 34

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця
кафедра біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії

ВСТУП

В боротьбі з епідемією туберкульозу, яка охопила Україну [8, 9], велике значення приділяють лікуванню з використанням одного з найбільш ефективних лікувальних засобів — ізоніазиду [3, 6]. В сучасних схемах лікування хворих на туберкульоз досить часто ізоніазид поєднують з вітаміном В₆ [1–6]. Загальновідомо, що вітамін В₆ (піридоксин гідрохлориду) є сполукою, яка допомагає

суттєво зменшити токсичний вплив ізоніазиду [5–7]. Але до цього часу відкритим залишається питання оптимального співвідношення доз цих препаратів у разі їх застосування з метою мінімізації токсичного впливу і максимізації лікувальної дії ізоніазиду. Загальноприйнятим у клініці співвідношенням ізоніазид/вітамін В₆ є 10/5 мг/кг, хоча експериментальних досліджень та математичного моделювання для обґрунтування

саме такого співвідношення не проводили [4, 6–9]. Здійснення експериментів такого типу повинні закінчуватись побудовою адекватної математичної моделі, а це, в свою чергу, потребує кількісного визначення загального стану організму в ході процесу захворювання та лікування. На хворих людях провести таку кількісну оцінку досить складно, тому у якості моделі використовують морських свинок, стан внутрішніх органів яких досить об'єктивно відтворює процеси лікування та інтоксикації.

Мета дослідження — за результатами лікування різними дозами ізоніазиду та вітаміну В₆ експериментального туберкульозу морських свинок визначити математичну модель цього процесу для встановлення оптимального співвідношення доз цих засобів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експеримент провели на 50 морських свинок з середньою вагою 250 г. Експериментальний туберкульоз викликали шляхом підшкірного введення свинкам мікобактерій туберкульозу лабораторного штаму H₃₇Rv у дозі 0,01 мг вологої ваги в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду.

На тлі генералізованого туберкульозного процесу було почато лікування тварин різними режимами хіміотерапії. За допомогою методу рандомізації сформувавши 9 груп (по 5 тварин в кожній):

- 1-ша група (контроль № 1): лікування загальноприйнятною дозою ізоніазиду — 10 мг/кг маси тварини,
- 2-га група: (контроль № 2): лікування ізоніазидом у дозі, що перевищує загальноприйнятую втричі, тобто 32 мг/кг,
- 3-тя група: (контроль № 3): лікування ізоніазидом у дозі, що перевищує загальноприйнятую у 10 разів, тобто 100 мг/кг,
- 4-та група: лікування ізоніазидом у дозі 10 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 5 мг/кг (загальноприйнятій дозі),
- 5-та група: лікування ізоніазидом у дозі 10 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 50 мг/кг (доза вітаміну В₆ в 10 разів перевищує загальноприйнятую),
- 6-та група: лікування ізоніазидом у дозі 32 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 5 мг/кг,
- 7-ма група: лікування ізоніазидом у дозі 32 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 50 мг/кг,
- 8-ма група: лікування ізоніазидом у дозі 100 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 5 мг/кг,
- 9-та група: лікування ізоніазидом у дозі 100 мг/кг та вітаміном В₆ у дозі 50 мг/кг,
- 10-та група (контроль): свинки були без лікування (тест на виживаність).

Через 1,5 міс від моменту зараження одну із свинок 10-ї групи забивали для контролю стану туберкульозного процесу, викликаного інокуляцією мікобактерій. У забитій свинці був виявлений гнійний абсцес на ділянці зараження та гнійне

ураження регіонарних до ділянки зараження лімфовузлів. Селезінка була різко збільшена з множиною осередків ураження. Печінка збільшена, рихла, вся у великих жовтих ураженнях. В легенях виявили множини великих та дрібних туберкульозних горбиків. Ступінь ураження оцінювали в умовних індексах ураженості у відповідності до критеріїв Р.О. Драбкіної, за якими максимально виражені макроскопічні ураження оцінюють в 100 умовних одиниць (у.о.). Для цієї свинки індекс ураження склав 90 у.о. Решта свинок (4) даної групи загинули від генералізованого туберкульозу у термін 1,5–2 міс після зараження. Індeksi ураженості в усіх були 100 у.о.

Кожну групу свинок розташували по кліткам окремо. Через 1,5 міс після зараження почали лікування свинок 1-ї–9-ї групи: ізоніазид вводили *per os*, вітамін В₆ — підшкірно, обидва препарати — 1 раз на добу. Через 8 тижнів лікування усі свинки цих груп залишались живими. Вони були забиті за допомогою етилового ефіру. Здійснили розтин тварин, оцінили макроскопічні туберкульозні ураження кожної окремо взятої свинки. Для гістологічного дослідження у кожній свинки взяли регіонарні до місця зараження лімфовузли, шматочки селезінки, печінки, легень, а також по одній нирці, і їх помістили у 10% розчин формаліну.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані в ході експерименту результати наведені в таблиці 1.

Наведені дані дозволяють кількісно визначити вплив кожного з двох факторів (перший фактор — величина дози ізоніазиду (D_{izoniaz}), другий — величину дози вітаміну В₆ (D_{B_6}) на ефективність лікування експериментального туберкульозу. Вплив кожного з факторів вивчали на трьох рівнях дози: для ізоніазиду — 10, 32 та 100 мг/кг, для вітаміну В₆ — 0, 5 та 50 мг/кг. Зазначені дози препаратів були підібрані таким чином, щоб загальноприйнята доза ізоніазиду (10 мг/кг) та загальноприйнята доза вітаміну В₆ (5 мг/кг) були найменшими в експерименті.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою спеціалізованої статистичної програми «Statistica v.6.». Застосований нами підхід не потребує попереднього визначення характеру зв'язку між концентрацією досліджуваних препаратів та їх фізіологічною дією. Крім того, він враховує вплив кожної тварини в групі на загальну картину і тому є найбільш об'єктивним [10].

Спеціалізована схема експерименту такого типу (факторний експеримент 3² — означає 2 фактори на 3 рівнях) побудована таким чином, що для 9 вимірювань, перебираються всі можливі їх комбінації. П'ятикратне повторення кожного з 9 вимірювань на тваринах, дає змогу розрахувати, крім функціональних, ще й статистичні показ-

Таблиця 1

Ступінь ураження туберкульозом морських свинок, у.о.

Група	Доза препарату, мг/кг		Індекс ураженості органів кожної свинки в групі					Середній індекс ураженості в групі
	ізоніазид	вітамін В ₆	1	2	3	4	5	
1-ша	10	0	25	29	22	25	35	27,2
2-га	32	0	25	38	27	31	36	31,4
3-тя	100	0	35	39	34	36	33	35,4
4-та	10	5	22	19	24	35	19	23,8
5-та	10	50	23	17	10	7	19	15,2
6-та	32	5	7	16	9	13	17	12,4
7-ма	32	50	32	20	22	26	22	24,4
8-ма	100	5	17	7	24	19	11	15,6
9-та	100	50	38	16	7	20	7	17,6
10-та	0	0	90	100	100	100	100	98,0

ники [10–12]. Результати обробки такого факторного експерименту наведені в таблиці 2.

Загальний рівень значущості обраної моделі є не досить високим ($R^2=0,61$), тобто він пояснює лише 61% експериментальних результатів. У повному вигляді вплив 2 досліджуваних факторів на значення індексу ураженості органів морських свинок при лікуванні експериментального туберкульозу буде наступним [10–12]:

$$\text{Індекс ураженості} = 20,92 + 0,01 \times (D_{\text{ізоніаз}}) + 0,66 \times (D_{\text{ізоніаз}})^2 - 6,38 \times (D_{\text{В}_6}) - 7,09 \times (D_{\text{В}_6})^2 - 1,45 \times (D_{\text{ізоніаз}}) \times (D_{\text{В}_6}) - 3,96 \times (D_{\text{ізоніаз}}) \times (D_{\text{В}_6})^2 + 1,60 \times (D_{\text{ізоніаз}})^2 \times (D_{\text{В}_6}) - 3,06 \times (D_{\text{ізоніаз}})^2 \times (D_{\text{В}_6})^2$$

Але, як видно з таблиці 2, деякі коефіцієнти мають низьке значення критерію Стюдента і, відповідно, низький рівень значущості (p). Тому, коефіцієнти з рівнем значущості $p > 0,1$ були виведені із рівняння як незначущі.

Після перерахування моделі її загальний рівень значущості дещо знизився ($R^2=0,57$), але стали вагомими усі залишені коефіцієнти (табл. 3).

Таким чином, в остаточному вигляді отримана математична залежність індексу ураженості органів морських свинок після лікування ізоніазидом та вітаміном В₆ має наступний вигляд:

$$\text{Індекс ураженості} = 20,92 - 6,13 \times (D_{\text{В}_6}) - 7,00 \times (D_{\text{В}_6})^2 - 3,38 \times (D_{\text{ізоніаз}}) \times (D_{\text{В}_6})^2 - 3,70 \times (D_{\text{ізоніаз}})^2 \times (D_{\text{В}_6})^2$$

Отримане рівняння виявилось дещо несподіваним, оскільки до нього не входять значення дози самого ізоніазиду ($D_{\text{ізоніаз}}$) та $(D_{\text{ізоніаз}})^2$. Цей результат пояснюється вибраними дозами в експерименті. Мінімальний рівень дози ізоніазиду та вітаміну В₆ (10 та 5 мг/кг, відповідно) є загальноприйнятою лікувальною дозою. Як виявилось, подальше збільшення дози ізоніазиду в ході експерименту вже не призводить до посилення лікувального ефекту, але зростає його токсичність [7]. Так, наприклад, за відсутності вітаміну В₆, збільшення дози ізоніазиду (10, 32, 100 мг/кг) призводить не до зменшення індексу ураженості, а навпаки, до його збільшення (27,2; 31,4 та 35,4%, відповідно) (див. табл. 1). На

Таблиця 2

Коефіцієнти залежності індексу ураженості від дози ізоніазиду та вітаміну В₆ та їх статистичні характеристики

Фактори та їх взаємодії	Коефіцієнт	Статистична похибка	Критерій Стюдента	Рівень значущості, p
Вільний член	20,92	1,06	19,65	0
$D_{\text{ізоніаз}}$	0,01	1,28	0,01	0,99
$(D_{\text{ізоніаз}})^2$	0,66	1,15	0,58	0,57
$D_{\text{В}_6}$	-6,38	1,24	5,15	0
$(D_{\text{В}_6})^2$	-7,09	1,18	6,00	0
$D_{\text{ізоніаз}} \times D_{\text{В}_6}$	-1,45	1,49	0,98	0,34
$(D_{\text{ізоніаз}}) \times (D_{\text{В}_6})^2$	-3,96	1,42	2,79	0,01
$(D_{\text{ізоніаз}})^2 \times D_{\text{В}_6}$	1,60	1,34	1,20	0,24
$(D_{\text{ізоніаз}})^2 \times (D_{\text{В}_6})^2$	-3,06	1,28	2,39	0,02

Примітка. $D_{\text{ізоніаз}}$ та $D_{\text{В}_6}$ - доза ізоніазиду та вітаміну В₆, відповідно.

Вагомі коефіцієнти залежності індексу ураженості від дози ізоніазиду та вітаміну B₆ та їх статистичні характеристики

Фактори та їх взаємодії	Коефіцієнт	Статистична похибка	Критерій Стьюдента	Рівень значущості, p
Вільний член	20,92	1,04	20,08	0
D _{B₆}	-6,13	1,21	5,06	0
(D _{B₆}) ²	-7,00	1,18	5,94	0
(D _{ізоніаз}) × (D _{B₆}) ²	-3,38	1,29	2,62	0,013
(D _{ізоніаз}) ² × (D _{B₆}) ²	-3,70	1,16	3,18	0,003

противагу ізоніазиду, вплив значення дози вітаміну B₆ на вираженість лікувальної дії виявився досить суттєвим. Але форма цієї залежності є також складною через лінійні та квадратичні члени, як для самого вітаміну B₆, так і для його комбінації з ізоніазидом. Цей результат можна продемонструвати на прикладах таблиці 1. Так, за сталої дози ізоніазиду 10 мг/кг, збільшення дози вітаміну B₆ (0; 5 та 50 мг/кг) призводить до зменшення індексу ураженості (27,2; 23,8 та 15,2%, відповідно). Але, за сталої дози ізоніазиду 32 мг/кг, вплив вищезазначених доз вітаміну B₆ є більш складним. Спочатку індекс ураженості знижується від 31,4 до 12,4%, а потім при застосуванні дози вітаміну 50 мг/кг знову зростає до 24,4%. Аналогічна залежність проявляється і за сталої дози ізоніазиду 100 мг/кг — індекс ураженості становить 35,4; 15,6 та 17,6%, відповідно. Такі результати демонструють складність форми математичної залежності ефективності лікування від концентрації лікарських засобів. Тривимірний графік залежності індексу ураженості органів (вісь Z) від дози ізоніазиду (вісь X) та вітаміну B₆ (вісь Y) наведений на рисунку.

Як видно з цього графіку, по осі ізоніазиду (X) практично немає мінімальної точки, тобто індекс ураженості органів, у вибраному діапазоні, майже не залежить від концентрації ізоніазиду.

Проте по осі вітаміну B₆ (Y) ми маємо добре виражений мінімум, який припадає на дозу 26 мг/кг. Висока крутизна обох поверхонь свідчить, що навіть невелике відхилення від зазначеного мінімуму, призводить до різкого зростання індексу ураженості.

ВИСНОВКИ

Загальноприйнята в клініці доза ізоніазиду 10 мг/кг є майже оптимальною, оскільки подальше її збільшення не призводить до більш вираженого лікувального ефекту, однак доза вітаміну B₆ 5 мг/кг — не достатньо ефективна [6]. Враховуючи отримані результати дозу ізоніазиду 10 мг/кг доцільно не змінювати, а дозу вітаміну B₆ збільшити майже у 5 разів — до 26 мг/кг. Звичайно ці результати отримані лише в експерименті на тваринах, тому, для їх остаточного підтвердження, в подальшому планується перевірити ефективність такого співвідношення препаратів в клінічних умовах при лікуванні хворих на туберкульоз.

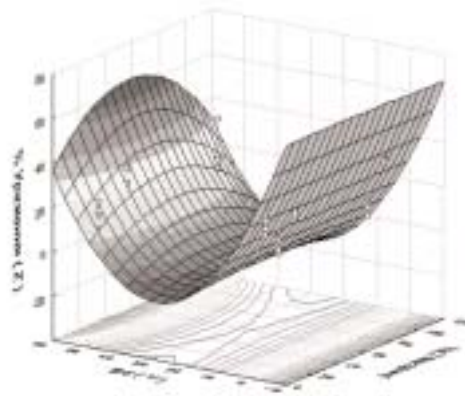


Рисунок 1. Залежність індексу ураженості органів морських свинок (вісь Z) від дози ізоніазиду (вісь X) та вітаміну B₆ (вісь Y).

ЛІТЕРАТУРА

1. Гайова Л.В., Овруцький О.В. (2001) Вплив особливої структури піридоксину, піридоксалу, піридоксаміну на їх біологічну активність щодо *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* та росту білих мишей. В кн.: II Національний з'їзд фармакологів України, Дніпропетровськ, с. 48.
2. Гайова Л.В., Овруцький О.В., Бобкова Л.С. та ін. (2002) Особливості будови і реакційна здатність піридоксину, піридоксалу, піридоксаміну та ізоніазиду. Ліки, 1–2: 94–97.
3. Гайова Л.В., Шарикіна Н.І., Бобкова Л.С. та ін. (2002) Гальмування росту культури мікобактерії туберкульозу ізоніазидом, вітаміном B₆ та піридоксальфосфатом в досліді *in vitro*. Зв'язок «структура-активність» з використанням квантово-хімічних розрахунків. Укр. пульмонолог. журн., 2(36): 54–57.
4. Коденцова В.М., Глінка Е.Ю. (1990) Изменение кинетических свойств пиридоксальзависимых ферментов при алиментарной недостаточности витамина B₆ у крыс. Укр. биохим. журн., 1: 44–49.
5. Лужников Е.А. (1999) Клиническая токсикология. Медицина, Москва, 416 с.
6. Машковский М.Д. (1988) Лекарственные средства: в 2-х томах. Т. 2, Медицина, Москва, 576 с.
7. Brown A., Mallett M., Fiser D., Arnold W.C. (1984) Острое отравление изониазидом: обратимость симптомов поражения ЦНС при лечении большими дозами пиридоксина. *Pediatr. Pharmacol.*, 3(4): 199–202.
8. Oswald G.R., Afanasiev N.Y., Cegielski J.P., Binkin N.J. (1999) Tuberculosis in Russia. *Lancet*, 354(9183): 1036.
9. Rusch-Gerdes S. (1999) Epidemiology of resistant tuberculosis in Europe. *Infection. Suppl.* 2: 17–18.
10. Боровиков В.П., Боровиков И.П. (1997) Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. Филінь, Москва, 608 с.
11. Максимов В.Н. (1980) Многофакторный эксперимент в биологии. Изд-во Моск. ун-та, Москва, 280 с.
12. Лисенков А.Н. (1979) Математические методы планирования многофакторных медико-биологических экспериментов. Медицина, 344 с.