

Оригинальная статья

УДК 611.08:615-9

ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ТОКСИЧНОСТИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА И ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ¹А.С. Жарков, ²В.А. Шкурупий, ³Е.А. Лядов, ¹Б.В. Певченко, ¹В.Н. Беляев,²А.В. Троицкий, ²Е.П. Гуляева, ²Т.Н. Быстрова, ⁴В.П. Куликов¹Открытое акционерное общество «ФНПЦ «Алтай», г. Бийск,²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр клинической и экспериментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск,³Краевое государственное казенное учреждение здравоохранения

«Алтайский краевой противотуберкулезный диспансер», г. Барнаул,

⁴Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Алтайский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Барнаул.

EVALUATION OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS AND TOXICITY OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUG BASED ON OXIDIZED DEXTRAN AND THE HYDRAZIDE OF ISONICOTINIC ACID

A.S. Zharkov, W.A. Shkurupiy, E.A. Lyadov, B.V. Pevchenko, V.N. Belyaev,

A.V. Troitsky, E.P. Gulyaeva, T.N. Bystrova, V.P. Kulikov E

Резюме

В статье представлены результаты доклинических исследований противотуберкулезного средства на основе окисленных декстранов и гидразида изоникотиновой кислоты. В результате проведенной работы были установлены фармакокинетические характеристики и параметры острой токсичности разрабатываемого противотуберкулезного средства. По показателю летальности животных, проявлению реакции со стороны нервно-мышечной и сердечно-сосудистой систем (клонические судороги, атаксия, гипер- и гипокинезия, выделение пены изо рта) декстразид показал большую токсичность по сравнению с ГИНК при однократном внутрибрюшинном и внутривенном введении. При этом препарат не оказывал токсического воздействия на интегральные показатели у большинства выживших экспериментальных животных.

Ключевые слова: Декстразид, окисленный декстран, полиальдегиддекстран, изониазид, гидразид изоникотиновой кислоты, фармакокинетика, острая токсичность.

Resume

The article presents the results of pre-clinical studies of antituberculosis drug based on oxidized dextran and the hydrazide of isonicotinic acid. As results of conducted study pharmacokinetic characteristics and parameters of acute toxicity of developing drug were determined. After single intraperitoneal and intravenous administration dex-trazide showed greater toxicity compared with INH as evidenced by the mortality of animals, the manifestations of the responses from the neuro-muscular and cardiovascular systems (clonic convulsions, ataxia, hyper- and hypokinesia, foam). At the same time the drug had no toxic effects on integral indicators of the majority of the survived experimental animals.

Key words: Dextrazide, oxidated dextrazide, polyaldehyde dextran, isoniazid, isonicotinic acid hydrazide, pharmacokinetics, acute toxicity

Введение

В настоящее время перед руководством РФ стоит задача снижения числа больных туберкулезом с критической отметки (в среднем более 83 человек на 100 тыс. населения). Для решения данной проблемы предлагается противотуберкулезная фармацевтическая композиция (ФК) «Декстразид» (ДЗ) для внутривенного введения, состоящая из конъюгата гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК) с высокомолекулярным окисленным декстраном (ОД) и свободного ГИНК.

Окисленные декстраны являются новым перспективным типом сырья для фармацевтической промышленности и представляют собой

вспомогательное вещество, используемое в процессе изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств. Химически активные группы, образующиеся в результате окисления декстранов, могут ковалентно связываться (конъюгировать) с лекарственными низкомолекулярными соединениями, что позволяет значительно улучшить их терапевтические свойства: обеспечить внутриклеточную пролонгированность действия, что особенно актуально при создании лекарственных средств для лечения инфекций с внутриклеточной персистенцией возбудителя, например, туберкулеза [6].

Научные основы создания противотуберкулезной фармацевтической композиции с использованием конъюгата ГИНК с окисленным декстраном разработаны под руководством академика РАМН В.А. Шкурупия. Ранее было показано, что такой конъюгат обладает способностью подавлять развитие популяции *Mycobacterium tuberculosis*, оказывая внутриклеточное воздействие [1]. Такой механизм действия конъюгата, входящего в состав ФК, определяет отличие и уникальность разрабатываемого противотуберкулезного средства по сравнению с существующими в настоящее время препаратами, которые действуют внеклеточно. При этом наличие ОД в ФК позволяет снизить в 2-2,5 раза гепатотоксичность ГИНК [1]. Свободный ГИНК в ФК в свою очередь, обеспечивает эффективное подавление развития внеклеточной популяции *Mycobacterium tuberculosis*. По антимико-бактериальной активности *in vitro* ДЗ не уступает ГИНК, в тоже время за счет ОД

ДЗ значительно менее гепатотоксичен и обладает большей антибактериальной активностью в отношении внеклеточной и внутриклеточной популяции микобактерий [1]. Минимальная ингибирующая активность (МИК) ДЗ (по ГИНК) соответствует МИК ГИНК и составляет 0,015–0,05 мг/мл.

При выполнении работ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса РФ на 2007-2013 гг.» в ОАО «ФНПЦ «Алтай» впервые в РФ создано опытно – промышленное производство окисленных декстранов, а с 2012 года в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Рос-сийской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» реализуется государственный контракт №14.N08.12.0007 «Доклинические исследования противотуберкулезной фармацевтической композиции на основе конъюгата гидразида изоникотиновой кислоты и декстрана».

Целью работы является проведение доклинических исследований инновационной ФК на основе конъюгата ГИНК и окисленного декстрана для чего в представленной работе решались задачи по оценке фармако-кинетических параметров и острой токсичности ФК по основному действующему веществу.

Материалы и методы

При проведении исследований использовались опытные партии ДЗ, изготовленные ОАО «ФНПЦ «Алтай».

Таблица 1

Содержание компонентов в фармацевтической композиции ДЗ

Наименование компонента	Содержание компонента
Содержание конъюгата в ДЗ	55,5 мг/мл
Содержание ГИНК в конъюгате (в 1 г конъюгате)	16 мг/г
Содержание свободного ГИНК в ДЗ	53 мг/мл

Исследования проводились на мышах линии АСR и нелинейных мышах, крысах линии Winstar в соответствии с ГОСТ Р 52379-2005. «Надлежащая клиническая практика», приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», наставлениям по диагностике туберкулеза животных, утвержденных Департаментом ветеринарии от 18.11.2002 г. по [2, 5, 7].

При исследовании фармакокинетики Научным

центром клинической и экспериментальной медицины, доза вводимого раствора по ГИНК составляла 30 мг/кг. Животных взвешивали непосредственно перед введением вещества для расчета дозы на животное. Растворы ДЗ вводили внутривенно в хвостовую вену. Забор крови проводили из яремной вены, предварительно подвергнув животное легкому эфирному наркозу, в следующие временные точки после введения ДЗ: 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 мин. Кровь центрифугировали 15 мин при 2000 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf) и

полученную сыворотку крови исследовали мето-дом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией ГИНК. ВЭЖХ анализ проводили с использованием модульного хроматографического комплекса HPLC Shimadzu LC-20AD, на колонке BioSep-SEC-S 3000 Phenomenex 300x7,8 мм; элюент - 0,1 М Трис-фосфатный буфер pH 7,1; скорость подачи элюента – 1 мл/мин; объем пробы – 20 мкл; длина волны детектирования – 264 нм.

Исследование фармакокинетики ДЗ в тканях органов (печень, почки, селезенка) проводили цитохимическим методом с использованием флуоресцентно-абсорбционной микроскопии и дифференциально-интерференционного контраста. Для визуализации ДЗ использовали его в виде модельного соединения, получаемого при конъюгации гидразида биотина и ОД (ДЗbt). Выбор исследуемых органов обусловлен требованиями методических рекомендаций по исследованию фармакокинетики новых лекарственных средств, в частности вводимых внутривенно [7].

Доза вводимого раствора по ДЗbt составляла 125 мг/кг. Животных взвешивали непосредственно перед введением вещества для расчета дозы на животное. Растворы ДЗbt вводили внутривенно в хвостовую вену. Забор органов проводили, предварительно умерщвляя мышей дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом, в следующие временные точки после введения ДЗbt: 1, 5, 24, 48 и 72 часа.

После извлечения органы замораживали при температуре -200 С. Через 2-3 дня после замораживания, образцы органов не размораживая помещали в аппарат для получения криостатных срезов в криотоме CryoStar NX70 (Microm, Германия, «Thermo Scientific») и делали серию криостатных срезов толщиной 30 мкм. Срезы помещали на предметные стекла SUPERFROST («Thermo Scientific») и проводили стандартную цитохимическую окраску, включающую последовательную инкубацию образцов с конъюгатом стрептавидин-пероксидазой (30 мин) и инкубацию в субстрате с хромогеном диаминобензидином (2 мин). Гистологические препараты, полученные таким образом, фотографировали при помощи цифровой камеры AxioCam HR в микроскопе AxioVision Z1 («Zeiss», Германия) при увеличении объектива x20 для дальнейшего морфометрического анализа, используя для калибровки изображений морфометрический модуль программы «AxioVision v.8».

При проведении морфометрического анализа цифровых изображений окрашенных цитологических

препаратов применялась морфометрическая программа «ВидеоТест Морфо 3.2» (г. Санкт-Петербург). Для количественной оценки содержания ДЗbt в препарате в автоматическом режиме определяли суммарную площадь окраски (в квадратных пикселях – пиксель кв.).

Исследование острой токсичности лекарственной субстанции ДЗ Алтайским государственным медицинским университетом продолжалось 16 дней и было проведено на 70 нелинейных мышах, массой $32,9 \pm 4,3$ грамма, 70 крысах линии Wistar, массой $251,7 \pm 38$ грамм. Все животные были разделены на равные группы, соответствующие дозировке лекарственной субстанции, вещества сравнения и контрольного вещества (физиологический раствор). Вещества вводились внутривенно. Объем вводимого раствора соответствовал массе животного и составлял 0,06 мл / 10 г мыши и 0,6 мл / 100 г крысы. Необходимая дозировка препарата достигалась его разведением 0,9% раствором NaCl, непосредственно в шприце, перед инъекцией. Для достижения сопоставимости результатов дозировка ДЗ устанавливалась на основе содержания в препарате ГИНК. Наблюдение за животными, находящимися в эксперименте проводилось ежедневно. Оценка физиологического состояния животных/смертности проводилась дважды в первый день (в первой и второй половинах дня) и один раз в день в течение последующих 13-ти дней наблюдений. Взвешивание животных на весах ViBRA AJH-4200CE (Япония) проводилось в первый день исследования (до инъекции), и, впоследствии, один раз в неделю. Измерение температуры тела животных производилось в первый день исследования (до инъекции), и, впоследствии, один раз в неделю. Определение двигательной активности и выраженности исследовательского/ оборонительного поведения с использованием установки «Открытое поле» [1, 5] (НПК «Открытая наука», Россия), предназначенной для оценки выраженности поведенческих элементов грызунов в новых (стрессогенных) условиях. Тестирование проводилось на 2-ой день после введения препарата, а далее, на 8-ой и 15-ый день.

Острая токсичность рассчитывалась по соотношению количества павших/выживших животных при помощи пробит-анализа по методу Прозоровского [4].

Полученные результаты были обработаны с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для всех количественных данных вычисляли групповое

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ДЗ (по изменению концентрации ГИНК в сыворотке крови) при однократном внутривенном введении (средняя масса животных в группе 0,03 кг, доза 30 мг/кг по ГИНК).

Параметр	Значение	Единица измерения
$T_{1/2}$	194±53	мин
AUC_{0-t}	2,8±0,7	мг/мл ⁻¹ мин ⁻¹
AUC_{∞}	3,4±0,4	мг/мл ⁻¹ мин ⁻¹
$AUMC_{\infty}$	540,4±73,0	мг/мин ⁻² мл ⁻¹
MRT	161±13	мин
V_{ss}	42±15	мл
Cl	0,312±0,065	мл/мин

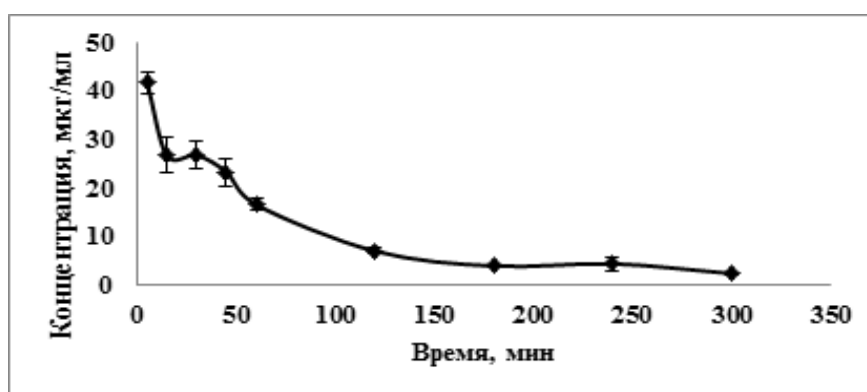


Рисунок 1. ТКонцентрация ДЗ в сыворотке крови, по ГИНК.

Таблица 3

Распределение и элиминация ДЗbt по органам после однократного внутривенного введения (пиксел кв. – единица измерения суммарной площади окраски).

Орган	Контроль	Содержание ДЗbt в криостатных срезах органов, пиксел кв.				
		1 ч.	5 ч.	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Селезенка	6261,9±1216,9	16226±1807	62997±4460	43313±5130	26001±2066	13150±2127
Почки	5351,75±943,4	88109±6920	83524±6276	72356±5971	17176,6±2398	12780±4729
Печень	11792,9±3855,6	25798±3976	46425±7761	68970±6646	22999±4127	20561±3966

Таблица 4

Смертность в группах мышей.

Вещество	Доза, мг\кг	Количество погибших животных, n	Общее количество животных в группе, n
Декстразид	600	10	10
	400	9	10
	200	0	10
Декстразид (по суммарному ГИНК)	330	10	10
	220	9	10
	110	0	10
Изониазид	300	8	10
	200	4	10
	100	0	10
0,9% раствор NaCl	0	0	10

среднее арифметическое в группе, стандартную ошибку среднего (SE), доверительный интервал ($P=0,95$; $t=1,96$). Для анализа фармакокинетических параметров использовали программу PK Solutions, USA. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ OriginPro 7.5.

Параметры острой токсичности (LD10, LD16, LD50 и LD84) определялись при помощи пробит-анализа по методу Прозоровского с указанием доверительного интервала для LD50.

Результаты

Как видно из результатов на рисунке 1 и в таблице 2 параметры элиминации ДЗ из крови (по ГИНК) в наибольшей степени соответствует литературным данным фармакокинетики ГИНК, в частности T1/2

Исходя из данных о количестве павших/выживших животных был проведен пробит-анализ и определены основные параметры острой токсичности (таблица 5).

Таблица 5

Параметры острой токсичности Декстразида и ГИНК у мышей.

	ДОЗА (мг/кг)	
	Декстразид (по суммарному ГИНК)	ГИНК
LD ₁₀	103,1	130,7
LD ₁₆	123,3	152,3
LD ₅₀	195,0 (144,3 – 245,7)	229,2 (204,9 – 253,5)
LD ₈₄	266,6	306,1
LD ₁₀₀	286,8	344,6

Таким образом, исходя из результатов таблицы 4 и 5, для всех ЛД Декстразид (по суммарному ГИНК) более токсичен, чем ГИНК, что может быть обусловлено наличием в составе ФК ОД, обеспечивающего более эффективное поступление ГИНК в клетки организма.

При исследовании острой токсичности ДЗ и ГИНК для крыс нам не удалось достигнуть среднесмертельной дозы, что говорит о том, что она составляет более 300 мг/кг. Это позволяет сделать заключение о низкой токсичности исследуемых веществ для крыс, аналогично данным, полученным в работах [3, 11]. Этот факт, по нашему мнению, может быть связан с низкой видовой чувствительностью некоторых видов грызунов к ГИНК, описанной в [8,10].

При однократном внутривенном введении ДЗ и ГИНК токсическое действие веществ в максимальных и средних дозах проявлялось реакцией со стороны нервно-мышечной и сердечно-сосудистой систем (клонические судороги, атаксия, гипер- и гипокинезия, выделение пены изо

рта). Данные реакции при соответствующей дозировке препаратов могли заканчиваться летальным исходом в течение первых 6 часов с момента введения препаратов. Животные, выжившие после первых суток эксперимента, в дальнейшем не проявляли выраженных внешних признаков интоксикации, а физиологическое состояние у них находилось в пределах нормы.

В результате патологоанатомического исследования павших во время эксперимента животных было установлено, что основными причинами смерти являлись отек легких, отек мозга, кровоизлияния в головной мозг, с прорывом в боковые желудочки, острая печеночная недостаточность и острая сердечная недостаточность.

При макроскопическом исследовании внутренних органов и анализе коэффициентов их масс у животных, подвергнутых эвтаназии после окончания эксперимента, были обнаружены гепато- и спленомегалия у подавляющего числа

мышей, получавших максимальные и средние дозы препаратов. В группах мышей, получивших минимальные дозы препаратов, была обнаружена спленомегалия у 70% мышей в группе, которой вводился 200 мг/кг ДЗ и у 30% мышей в группе, которой вводился ГИНК в той же дозе. Гепатомегалия была выявлена у 80% мышей в обеих указанных группах.

У крыс изменения, обнаруженные в ходе макроскопического исследования, встречались редко. При макроскопическом исследовании животных, составляющих интактные группы, не было выявлено никакой видимой патологии. Однократное внутрибрюшинное и внутривенное введение ДЗ и ГИНК не оказывало токсического воздействия на интегральные показатели (масса тела, температура) у большинства выживших экспериментальных животных. Прирост массы тела экспериментальных животных во время наблюдения находился в пределах физиологической нормы.

Отклонения в динамике прироста массы тела у мышей в группе, которой вводили 300 мг/кг ГИНК, связаны с большим процентом павших животных в данной группе. Колебания температуры тела мышей находились в пределах физиологической нормы для каждого вида животных (мышь – 38-39°C).

У крыс в экспериментальных группах, которым вводился ГИНК в количестве 200 мг/кг и 100 мг/кг на 7-ой день отмечалось увеличение температуры до 38,2°C и 38,7°C, соответственно. На 14-ый день температура тела у животных в этих группах снизилась до 38,1°C и 38,5°C, соответственно. В остальных группах крыс при введении ГИНК и в группах крыс при введении ДЗ температура тела находилась в пределах видовой нормы (крысы – 37-38°C).

Оценка поведенческих реакций с использованием тест-системы «Открытое поле» показала, что в группе мышей, которой вводился 200 мг/кг ГИНК, на 2-ой день эксперимента произошло снижение двигательной активности на 11,6%, а в группе мышей, которой вводился 100 мг/кг ГИНК, на 8-ой день эксперимента произошло снижение исследовательской реакции в 1,5 раза, по сравнению с интактными мышами. В группах животных, которым вводили ДЗ, данные симптомы не отмечались.

При исследовании крыс было отмечено, что в группах, которым вводился 400 мг/кг и 100 мг/кг ГИНК, на 8-ой день эксперимента было отмечено снижение исследовательской реакции по сравнению с интактной группой на 70% и 60%, соответственно.

На 15-ый день эксперимента между опытными группами и интактной группой мышей не было достоверных различий, что говорит о восстановлении двигательной-исследовательской реакции. На 2-ой день эксперимента и на 15-ый день эксперимента между опытными группами и интактной группой крыс не было достоверных различий.

Выводы

В результате проведенных исследований было установлено, что фармакокинетика ДЗ при однократном внутривенном введении мышам состоит из двух фаз. В первой фазе (до 6 часов после введения) происходит элиминация свободного ГИНК и не захваченного клетками тканей конъюгата ГИНК с ОД, во второй фазе до 2,5 суток происходит элиминация конъюгата ГИНК с ОД из тканей внутренних органов (печень, селезенка, почки).

Определены параметры острой токсичности для ДЗ и лекарственного препарата сравнения ГИНК для мышей и крыс. Исследуемая ФК и ГИНК показали крайне низкую токсичность у крыс. Статистический анализ полученных данных по летальности животных и пробит-анализ позволяет сделать вывод о большей токсичности ДЗ по сравнению с ГИНК при однократном введении, что связано с наличием в составе ФК ОД, обеспечивающего более эффективное поступление ГИНК в клетки организма. При однократном внутрибрюшинном и внутривенном введении ДЗ и ГИНК токсическое действие веществ проявлялось реакцией со стороны нервно-мышечной и сердечно-сосудистой систем (клонические судороги, атаксия, гипер- и гипокинезия, выделение пены изо рта), при этом не оказывается токсического воздействия на интегральные показатели у большинства выживших экспериментальных животных.

Список литературы

1. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон /Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Москва. «Высшая школа», 1991 стр. 119-122.
2. Нормативные правовые акты, регламентирующие доклинические исследования безопасности и эффективности фармакологических веществ в Российской Федерации // в: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, глава I/ под ред. Хабриева Р.У., – М.:«Медицина», 2005- 13 – 27.
3. Основы токсикологии // Куценко С.А., С-Петербург

2002, М., 2007 «Издательство РАМН». –с. 119

4. Прозоровский В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых лe-тальности // Фармакология и токсикология, 1962, т. 25, № 1, с. 115-120.

5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч 1. – ФГБУ «НЦЭСМП», 2012. 944 С.

6. Шкурупий В.А., Саноцкий И.В., Уланова И.П.// Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. 9. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений – М.: Медицина, 1975. –321 С.

7. Фирсов А.А., Жердев В.П., Барманова Е.Ю., Родионов А.П., Фисенко В.П./ глава III. Методические указания по проведению доклинических исследований фармакокинетики фармакологических веществ и лекарственных средств// в: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению

новых фармакологических веществ под ред. Хабриева Р.У., – М.:«Медицина», 2005- 217-229.

8. Guide for the care and use of laboratory animals - National Academy press. –Washington, D.C. 1996. – 248 p.

9. Jackson H.F., Broadhurst P.L. The effects of parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats// Neuropharmacology. – 1982, -№21, -P.1279-1282.

10. Steeve Giguère, John F. Prescott, J. Desmond Baggot Isoniazid // Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4 edition, — Wiley-Blackwell, 2006. — 297 — 626.

11. Verma RK, Kaur J, Kumar K, Yadav AB, Misra A. Intracellular Time Course, Pharmacokinetics, and Bio-distribution of Isoniazid and Rifabutin following Pulmonary Delivery of Inhalable Microparticles to Mice // J. Antimi-crob. Agents Chemother., - 2008, 52 (9), 3195-3201.