

Ш. А. Шомуротов^{1,*}, О. Р. Ахмедов¹, А. С. Тураев¹, Г. Х. Мамадуллаев²

ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И ФАРМАКОКИНЕТИКА ПОЛИМЕРНЫХ КОНЬЮГАТОВ ИЗОНИАЗИДА И ЭТАМБУТОЛА

¹ Институт биоорганической химии АН РУз, Узбекистан, 100170, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83.

² Научно-исследовательский институт ветеринарии Узбекистана, Узбекистан, 140104, Самарканд.

* e-mail: hsha@mail.ru

Взаимодействием диальдегид-производного полигалактурановой кислоты последовательно с гидразидом изоникотиновой кислоты и этамбутолом получен конъюгат, содержащий гидразид изоникотиновой кислоты, присоединенный посредством азометиновой связи (20 ± 2 моль %), и этамбутол, присоединенный ионной связью (25 ± 2 моль %). В условиях *in vitro* на клинических штаммах *M. tuberculosis* и H37Rv, а также в условиях *in vivo* на штаммах Humanis и Bovis полученный конъюгат показал выраженную противотуберкулезную активность. При введении конъюгата крысам терапевтическая концентрация активных веществ (изониазида и этамбутола) в крови сохранялась дольше, чем их низкомолекулярных аналогов, что указывает на возможность пролонгирования их противотуберкулезной активности.

Ключевые слова: полигалактурановая кислота; гидразид изоникотиновой кислоты; этамбутол; конъюгат; противотуберкулезная активность.

В связи со спецификой лечения туберкулеза — комплексной терапией (одновременно несколькими противотуберкулезными препаратами), длительностью лечения, необходимостью назначения многократных приемов больших доз медикаментов и возникновение из-за этого токсико-аллергических осложнений — очень важно найти способ снижения дозировки противотуберкулезных препаратов. Одним из путей улучшения условий лекарственной терапии является создание и применение полимерных противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия. Такие препараты не только могут увеличить сроки действия туберкулостатиков, но и уменьшить их побочные эффекты, снизить общий расход препарата. Одним из путей получения таких макромолекулярных лекарственных систем является включение в макромолекулы полимера противотуберкулезных препаратов [1 – 3].

В работе синтезирован полимерный конъюгат полигалактурановой кислоты (ПГК) с противотуберкулезными препаратами гидразидом изоникотиновой кислоты (ИНК) и этамбутолом (ЭБ) [4, 5]. Синтез осуществляли в несколько стадий, которые представлены на схеме.

Экспериментальная химическая часть

В работе использованы гидразид изоникотиновой кислоты (ИНК), этамбутола дигидрохлорид (ЭБ) (Becton, Dickinson and Company Sparks), коммерческий пектин из кожуры цитрусовых (Sigma-Aldrich, США) со степенью этерификации 75 %.

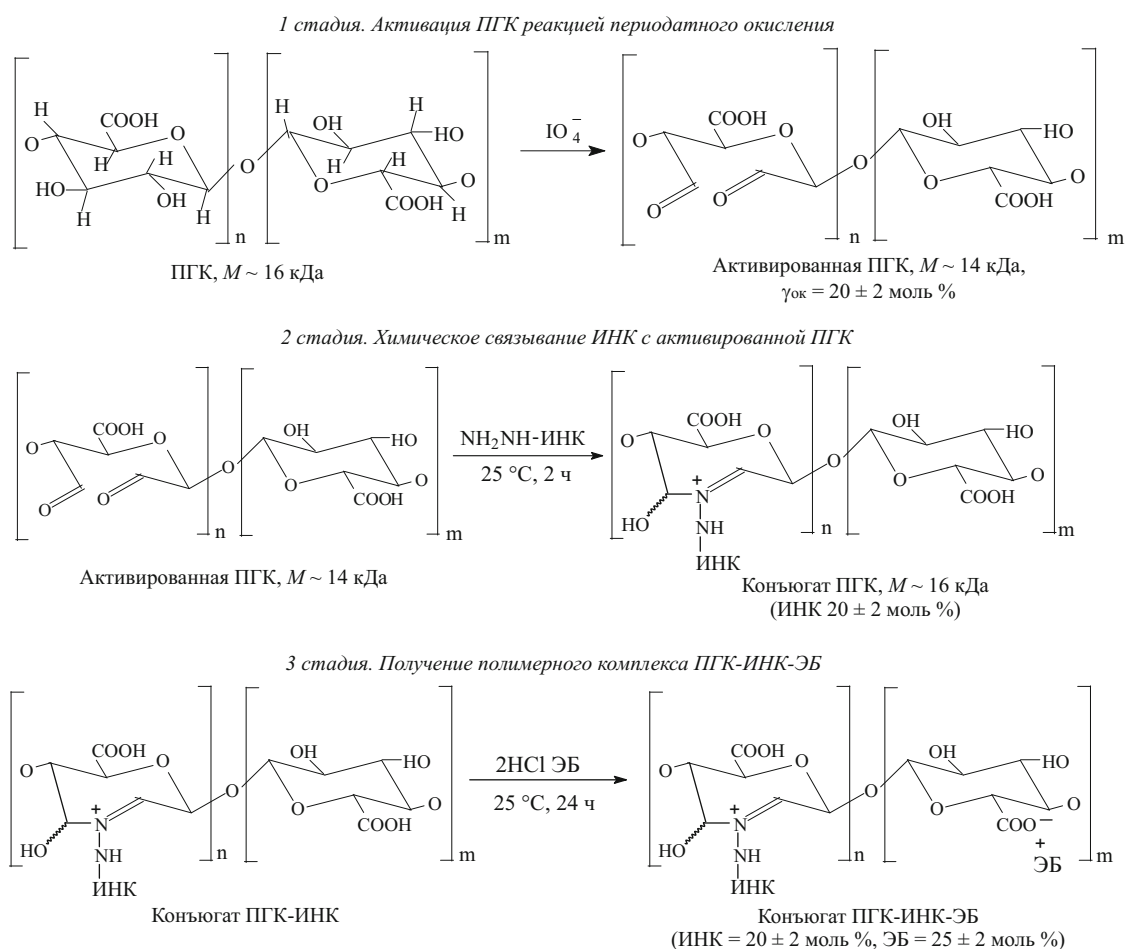
УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV 1280 производства фирмы Shimadzu (Япония), в кварцевых кюветах толщиной 1 см, в области 200 – 500 нм в водных растворах. ИК-спектры записывали на приборе Bruker Vektor-33, в диапазоне длин волн 500 – 4000 см^{-1} в таблетках с KBr.

Периодатное окисление ПГК. Олигомер ПГК (2 ммоль) растворили в буферном растворе (20 мл) с рН 4,5, добавляли NaIO_4 (2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 25 °С. Продукты реакции осаждали ацетоном. Осадок промывали 75 % водно-спиртовым раствором до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- . Выход 85 %. Степень окисления 20 – 25 моль % (определяли спектрофотометрическим (λ_{max} 222 нм) и йодометрическим методами). $M \sim 14$ кДа. Полученные диальдегид-производные ПГК в тот же день использовали для конъюгации с ИНК. В ИК-спектре присутствует полоса поглощения, характерная для деформационных колебаний эфирных карбонильных групп (R-CO-R), при 1746 см^{-1} . Полосы поглощения при 1612 и 1616, 1614 см^{-1} (окисленные формы) относятся к колебаниям свободной группы COO^- .

Конъюгат с ИНК. К раствору окисленной ПГК (2 ммоль), содержащей ~ 20 моль % окисленных звеньев, в воде (15 мл) добавляли ИНК (0,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 25 °С. Продукты реакции осаждали ацетоном, промывали в аппарате Сокслета в течение 3 ч. Продукт высушивали под вакуумом. Выход 91 % (содержание ИНК ~ 20 моль %; определено спектрофотометрическим методом λ_{max} 266 нм). $M \sim 16$ кДа. В ИК-спектрах имеются характерные полосы поглощения валентных колебаний при 3450 – 3400 (NH), 1700 – 1680 ($\text{HNC}=\text{O}$), 1560 – 1640 ($\text{C}=\text{N}$) и 1550 – 1450 см^{-1} (C-C и C-N). $M \sim 16$ кДа. Полученный конъюгат — темно-желтый порошок, растворимый в воде.

Конъюгат с ИНК и ЭБ. К раствору конъюгата ПГК-ИНК (2 ммоль) в воде (20 мл) добавляли раствор этамбутола дигидрохлорида (2 ммоль) в воде (15 мл). Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 25 °С, после чего ставили на диализ против дистиллированной

Схема



воды при комнатной температуре, периодически меняя воду до тех пор, пока раствор не перестал давать реакции на хлорид-ион с AgNO_3 (24 ч, общий объем диффузата ~ 5 л). Затем продукт реакции высушивали на ротационном испарителе. Выход ПГК-ИНК-ЭБ 88 % (содержание ЭБ ~ 25 моль %; определено спектрофотометрическим методом, основанным на взаимодействии ЭБ с роданидом ртути в кислой среде с образованием окрашенного в красно-оранжевый цвет продукта реакции, который дает поглощение при длине волны 457 нм). $M \sim 19$ кДа. Полученный конъюгат — коричневый порошок, растворимый в воде. В ИК-спектре ПГК-ИНК-ЭБ, кроме характерных полос поглощения гидроксильных (3450 см^{-1}), карбонильных групп (1760 см^{-1}), также имеется полоса поглощения в области $1560 - 1620 \text{ см}^{-1}$, относящаяся к поглощению вторичных аминогрупп в солевой форме.

Экспериментальная биологическая часть

Определение острой токсичности. Острая токсичность полимерного конъюгата была изучена на белых беспородных мышах массой 18–20 г обоего пола [6]. Соединения вводили в концентрациях 1 и 3 %, в зависимости от дозы, однократно натошак внутрибрюшинно. Действие соединений оценивали по изменению поведенческих реакций, общему состоянию и гибели

животных за 4 ч до и в течение 14 дней после введения препаратов. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики. Расчеты LD_{50} производили по методу Литчфильда и Уилькоксона.

Определение бактериостатической активности конъюгата проводили в соответствии с методикой, описанной в руководстве по доклиническому изучению противотуберкулезных препаратов [6] в условиях *in vitro* на вирулентных штаммах микобактерий туберкулеза H37Rv, Bovinus. Исследование проводили методом абсолютных концентраций с содержанием препаратов на питательной среде Левенштейна — Йенсена. Подсчёт колоний на среде проводили через 21 день. Количественная оценка результатов посева осуществлялась по общепринятой трехбалльной системе. Результаты учитывали путем ежедневного, начиная с 3 дня инкубации, сравнения сроков появления роста на питательной среде и оценки интенсивности роста колоний микобактерий туберкулеза (МБТ). Обращали внимание на изменение характеристики колоний при сравнении контроля и опыта — изменение культуральных свойств в виде формирования влажных гладких колоний. Использовались следующие концентрации конъюгата: 5, 10, 20 и 40 мкг/мл. Контролем служили образцы тех же культур МБТ на средах без препаратов. Противотуберкулезную активность конъюгата сравнивали с ИНК и ЭБ в концентрации 10 мкг/мл. В

условиях *in vivo* эксперименты проведены на 30 морских свинках массой 350 – 400 г, инфицированных вирулентными штаммами микобактерии туберкулеза Bovis и Humanis.

Фармакокинетические свойства. Изучение фармакокинетики конъюгата проводили на 56 беспородных белых крысах-самцах, массой тела 180 – 200 г. Контрольная группа — 3 особи. На каждую временную точку по 5 крыс, а также 3 крысы посажены в метаболические камеры для отбора образцов мочи. Испытуемый препарат опытным животным вводили перорально однократно в дозе 5 мг/кг (1 мл приготовленной суспензии) специальным зондом. Через 30 мин, 1, 2, 3, 5, 15, 24, 30, 48, 54 и 72 ч после введения соединения животных декапитировали под эфирным наркозом и отбирали кровь и органы (легкие, почки и печень). Также собирали мочу через 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96 и 120 ч после введения препарата. Органы взвешивали и лиофильно высушивали. Высушенные органы тщательно измельчали и делили пополам на 2 равные части. Кровь выдерживали в течение часа при комнатной температуре и центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин. В других образцах сыворотки крови осаждали белки 0,3 М трихлоруксусной кислотой. Мочу собирали, измеряли объем, отбирали по 1 мл для экстракции и лиофильно высушивали. ИНК, ЭБ и ацетил-ИНК экстрагировали из органов водой 1:2 из печени и 1:3 из легких и почек (м/в). Экстракты упаривали на ротаторном испарителе. Концентрацию ИНК и его метаболита ацетил-ИНК определяли методом ВЭЖХ на колонке Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (3 × 100 мм) [7]. ЭБ определяли спектрофотометрическим методом [8]. Расчеты фармакокинетических параметров проводили по программе Borgia.

Результаты и их обсуждение

Общий процесс получения полимерного конъюгата отображен на схеме, представленной выше. На первой стадии проводили функционализацию исходного полисахарида ПГК путем периодатного окисления. При этом получили диальдегид-производные ПГК, содер-

жащие 40 ± 5 моль % альдегидных групп. Далее проводили реакцию химического присоединения ИНК с полученным диальдегид-производным ПГК посредством азометиновой связи. На 3 стадии осуществляли присоединение этамбутола посредством ионной связи.

Структуру продуктов реакции устанавливали с помощью ИК-, УФ-спектроскопии и химическими методами анализа. Содержание действующих веществ (ИНК и ЭБ) в полимерном конъюгате определяли спектрофотометрическим методом по характерному поглощению ИНК при длине волны 262 нм [9], этамбутола в комплексе с роданидом ртути при длине волны 457 нм [10]. Полученный конъюгат представляет собой аморфный порошок желтовато-коричневого цвета, по растворимости и другим химическим свойствам отличается от исходных препаратов ИНК и ЭБ.

Результаты экспериментов по определению острой токсичности показали, что полимерный конъюгат менее токсичен по сравнению с исходными ИНК и ЭБ. В частности, ЛД₅₀ полимерного конъюгата более 3500 мг/кг, тогда как для ИНК и ЭБ составляет 224 и 1290 мг/кг соответственно.

Результаты тестов на лекарственную чувствительность штаммов МБТ (чувствительные и устойчивые) к исследуемым препаратам приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, конъюгат ПГК-ИНК-ЭБ во всех исследуемых концентрациях, как и ИНК и ЭБ в концентрации 10 мкг/мл, губительно действует на чувствительные штаммы МБТ (H37Rv и др.). Резистентные штаммы МБТ в концентрации 40 мкг/мл проявляли чувствительность к конъюгату ПГК-ИНК-ЭБ, а в остальных случаях проявляли устойчивость в различной степени.

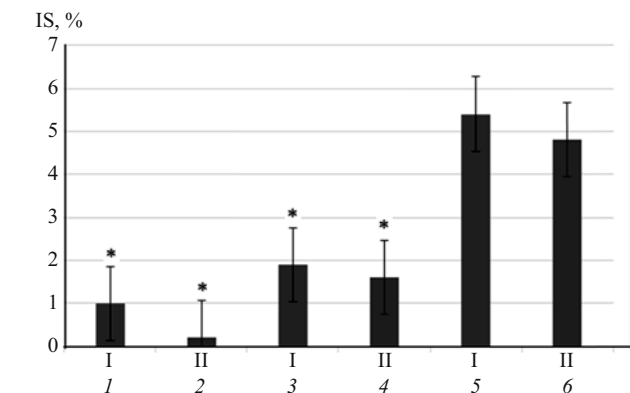
Проведены исследования по изучению бактериостатической активности конъюгата ПГК-ИНК-ЭБ по сравнению с ИНК в условиях *in vivo*. Исследование проводили на кроликах породы шиншилла, зараженных вирулентными штаммами микобактерии туберкулеза Humanis и Bovis. Бактериостатическую активность соединений оценивали по индексу поражения

Таблица 1

Оценка роста клинических штаммов МБТ с разной лекарственной устойчивостью на средах с конъюгатом ПГК-ИНК-ЭБ в концентрации 5, 10, 20 и 40 мкг/мл в сравнении с контролем (без соединений) и на средах с ИНК и ЭБ в концентрации 10 мкг/мл

Препарат	Конечная концентрация соединений, мкг/мл	H37Rv	Чувствительные штаммы		Устойчивые штаммы	
			16294 (пациент)	16947 (пациент)	11748 (пациент)	11891 (пациент)
ПГК-ИНК-ЭБ	40	—	—	—	—	—
	20	—	—	—	+	++
	10	—	—	—	++	+++
	5	—	—	—	++	+++
ЭБ	10	—	—	—	+++	+++
ИНК	10	—	—	—	+++	+++

«-» — чувствительные; «+» — от единичных до 20 КОЕ — «скудное» бактериовыделение, бактериоскопически микобактерии не определяются; «++» — от 21 до 100 КОЕ — «умеренное» бактериовыделение, бактериоскопически определяются единичные микобактерии в каждом поле зрения или единичные в препарате; «+++» — более 100 КОЕ — «обильное» бактериовыделение, бактериоскопически определяется 10 и более микобактерий в каждом поле зрения.



Индекс поражения животных при введении: 1, 2 — ПГК-ИНК-ЭБ; 3, 4 — ИНК; 5, 6 — контроль (без введения препаратов) ($n = 5$, * $P < 0,05$ по отношению к контролю); I — Humanis, II — Bovis.

внутренних органов, которую определяли по методу Р. Войтека (поражению селезенки) [11]:

$$IS = \frac{MC}{MT} \cdot 100 \%,$$

где IS — индекс поражения селезенки; MC — масса селезенки; MT — масса тела.

Результаты показали (рисунок), что полимерный конъюгат ПГК-ИНК-ЭБ проявляет выраженную противотуберкулезную активность, индекс поражения селезенки у него составил 1,0 % (Humanis) и 0,2 % (Bovis); при лечении изониазидом индекс поражения животных составил 1,9 % (Humanis) и 1,6 % (Bovis). У контрольных животных индекс поражения равен 5,4 % (Humanis) и 4,8 % (Bovis).

Исследование фармакокинетики полимерного конъюгата ПГК-ИНК-ЭБ проводили на беспородных белых крысах-самцах. Результаты показали, что после перорального введения конъюгата ПГК-ИНК-ЭБ терапевтические концентрации действующих веществ (ИНК и ЭБ) в крови и органах (легких, печени, почках, селезенке) сохраняется в течение 48 ч, а при введении ИНК и ЭБ в чистом виде данная концентрация ве-

ществ сохраняется в бактериостатических пределах до 12 ч.

Следует отметить, что при введении чистого ИНК в организм его значительная часть метаболизируется в печени до ацетилизониазида с помощью ариламин-*N*-ацетилтрансферазы второго типа (NAT2). Ацетилизониазид не проявляет противотуберкулезную активность и в дальнейшем гидролизует до изоникотиновой кислоты и ацетилгидразина. Последний метаболизируется до диацетилгидразина и может быть конвертирован печеночными микросомальными ферментами до реакционно способного вещества (вероятно, гидразин), который вызывает ИНК-индуцируемую гепатотоксичность [7]. При введении конъюгата химически связанная с макромолекулой ИНК в организме на 50 % меньше метаболизируется в терапевтически неактивный ацетилизониазид. Вероятно, это связано с макромолекулярной природой и, предположительно, нахождением в организме в виде комплексных олигомеров.

На основе полученных данных по количеству изониазида, этамбутола в сыворотке крови крыс проведены расчеты фармакокинетических параметров в программе Borgia [12]. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, при введении конъюгата период полувыведения увеличивается для обоих препаратов ИНК и ЭБ, скорость элиминации уменьшается, при этом увеличивается период полубсорбции и уменьшается скорость абсорбции. Для ЭБ не меняется равновесная максимальная концентрация, для ИНК и его полимерного аналога равновесная максимальная концентрация уменьшается на 75 %.

В составе конъюгата общий клиренс для ИНК и ЭБ увеличивается на 250 и 320 % соответственно. Подобная разница в величине клиренса связана с большей биодоступностью препаратов в составе конъюгата.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены высокомолекулярные конъюгаты ПГК-ИНК-ЭБ (ИНК ~ 20 моль % и ЭБ ~ 25 моль %), обладающие выраженной противотуберкулезной активностью и низкой токсичностью по сравнению с ис-

Таблица 2

Фармакокинетические параметры конъюгата ПГК-ИНК-ЭБ ($n = 5$, $P < 0,05$ по отношению к контролю)

Фармакокинетический параметр	Препарат сравнения*		Конъюгат ПГК-ИНК-ЭБ	
	ИНК	ЭБ	ИНК	ЭБ
Период полубсорбции $T_{1/2} (K_a)$, мин	108,281	468,243	175,221	959,834
Период полувыведения $T_{1/2} (K_{el})$, мин	693,000	1420,08	742,765	2887,50
Константа абсорбции K_a	0,00640	0,00148	0,00396	0,00072
Константа скорости элиминации K_{el}	0,00100	0,00049	0,00093	0,00024
Период полудостижения равновесной концентрации $T_{1/2} C_{ss \max}$, мин	0,290	0,366	0,341	0,366
Равновесная концентрация $C_{ss \max}$, мкг/мл	0,426	0,001	0,117	0,000
Объем распределения V_d , мл	2173,90	47559,3	5763,53	305574
Общий клиренс Cl_r , мл/мин	2,174	23,209	5,377	73,338
Площадь под кривой "концентрация — время" AUG	230001	468,243	92982,2	6817,8

* — препарат сравнения: механическая смесь ИНК (45 %) и ЭБ (55 %).

ходными препаратами ИНК и ЭБ. При введении конъюгата крысам терапевтическая концентрация активных веществ (изониазида и этамбутола) в крови сохранялась дольше, чем их низкомолекулярных аналогов, что указывает на возможность пролонгирования их противотуберкулезной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Платэ, А. Е. Васильев, *Высокомолек. соед.*, **24A**(4), 675 – 695 (1982).
2. Е. Ф. Панарин, *Синтез, структура и свойства полимеров*, Наука, Ленинград (1989), сс. 187 – 198.
3. Ш. А. Шомуротов, Э. А. Муродов, А. С. Тураев, *Хим. раст. сырья*, № 2, 25 – 28 (2006).
4. Ш. А. Шомуротов, Г. Х. Мамадуллаев, А. С. Тураев, *Журн. биомед. хим.*, № 1, 45 – 49 (2016).
5. Патент РУз 05630, *Офиц. бюлл.*, 6 (168) (2016).
6. В. В. Ерохина, *Культуральные методы диагностики туберкулеза*, Медицина, Москва (2008), сс. 164 – 179.
7. J. O. Svensson, A. Muchtar, O. Ericsson, *J. Chromatogr.*, **341**, 193 – 197 (1985).
8. А. И. Сливкин, В. Ф. Селеменев, Е. А. Суховерхова, *Физико-химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств*, ВГУ, Воронеж (1999), сс. 215 – 218.
9. Ш. А. Шомуротов, О. Р. Ахмедов, А. С. Тураев, *Фарм. вестник Узбекистана*, № 1, 44 – 49 (2016).
10. Методические указания МУК 4.1.1643-03, 1 – 8 (2003).
11. Т. Н. Ященко, И. С. Мечева, *Руководство по лабораторному исследованию при туберкулезе*, Медицина, Москва (1973), сс. 53 – 77.
12. USC*Pack P. C. Collection Clinical Research Programs, University of Southern California, School of Medicine, Los Angeles, Version 10.7 (1995).

Поступила 14.02.21

ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY AND PHARMACOKINETICS OF POLYMER CONJUGATES OF ISONIAZID AND ETHAMBUTOL

Sh. A. Shomurotov^{1,*}, O. R. Akhmedov¹, A. S. Turaev¹, and G. Kh. Mamadullaev²

¹ Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 100170 Uzbekistan

² Scientific Research Institute of Veterinary Medicine, Samarkand, 140104 Uzbekistan

* e-mail: hsha@mail.ru

The interaction of the dialdehyde derivative of polygalacturonic acid with isonicotinic acid hydrazide and ethambutol results in a conjugate containing isonicotinic acid hydrazide linked with a hydrazone bond (20 ± 2 mol %) and ionically bonded ethambutol (25 ± 2 mol %). The obtained conjugate showed pronounced anti-tuberculosis activity both *in vitro* experiments on clinical strains of *M. tuberculosis* and H37Rv, as well as *in vivo* on human and bovine strains. Pharmacokinetic studies showed that, upon introduction of the conjugate, the therapeutic concentration of active substances (isoniazid and ethambutol) in the blood was retained longer than their low molecular weight analogs, thereby exhibiting a prolonged anti-tuberculosis effect.

Keywords: polygalacturonic acid; isonicotinic acid hydrazide; ethambutol; conjugate; anti-tuberculosis activity.