

УДК 541.64:547.551  
©Коллектив авторов

## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗОНИАЗИДА И ЭТАМБУТОЛА

Ш.А. Шомуротов<sup>1\*</sup>, Г. Мамадуллаев<sup>2</sup>, А.С. Тураев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт Биоорганической химии АН РУз,  
Узбекистан, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83; эл. почта: ibchem@uzsci.net

<sup>2</sup>Научно исследовательский институт ветеринарии Узбекистана,  
Самаркандская область, Тайлякский район; эл. почта: uzniiiv@rol.uz

Путём химической модификации карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и полигалактуроновой кислоты (ПГК) с противотуберкулёзными препаратами изониазидом и этамбутолом получены макромолекулярные лекарственные системы “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П”. Оба препарата хорошо растворимы в воде и образуют истинные растворы. Фармако-токсикологическими исследованиями установлено, что макромолекулярные системы менее токсичны, чем исходные лекарственные препараты. Их противотуберкулёзная активность, идентичная немодифицированному изониазиду, проявляется в дозе, в шесть раз меньшей, чем у препарата сравнения. Фармакокинетические исследования показали, что при введении полимерных препаратов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” терапевтическая концентрация действующих веществ (изониазида и этамбутола) в крови сохраняется дольше, чем у немодифицированных препаратов. Введение изониазида в полисахаридную матрицу замедляет его метаболизм в терапевтически неактивный ацетилизониазид.

**Ключевые слова:** карбоксиметилцеллюлоза, полигалактуроновая кислота, полимер-носитель, туберкулёз, пролонгация

**DOI:** 10.18097/PBMC20166201045

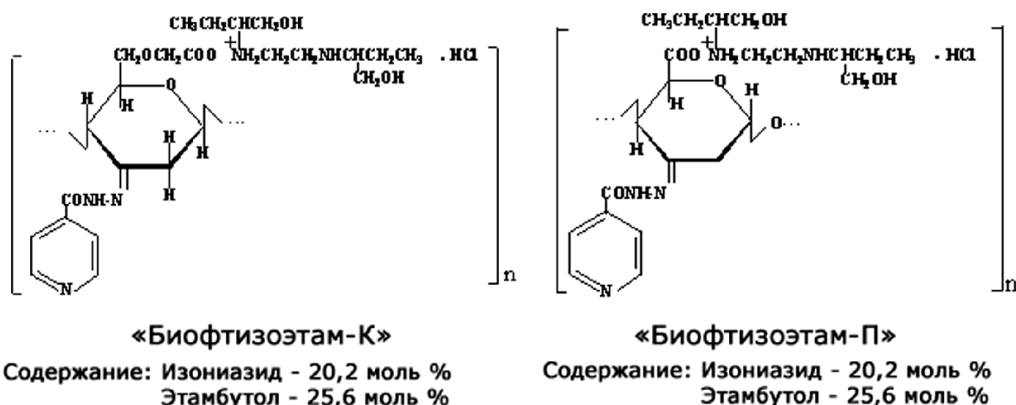
### ВВЕДЕНИЕ

В связи со спецификой лечения туберкулёза – комплексной терапией (одновременно несколькими противотуберкулёзными препаратами), длительностью лечения, необходимостью назначения многократных приёмов больших доз медикаментов и возникновением из-за этого токсико-аллергических осложнений – очень важно найти способ снижения эффективной дозировки противотуберкулёзных препаратов. Одним из путей улучшения условий лекарственной терапии является создание полимерных противотуберкулёзных препаратов пролонгированного действия. Такие пролонгированные противотуберкулёзные препараты не только увеличат сроки действия туберкулостатиков, но и уменьшат их побочные эффекты; снизится и общий расход препарата. Такие макромолекулярные лекарственные системы можно получить путём

включения в макромолекулы полимер-носителя противотуберкулёзных препаратов.

В связи с этим, нами были синтезированы макромолекулярные лекарственные системы, содержащие вдоль цепи макромолекулы два противотуберкулёзных препарата изониазида и этамбутола. В качестве полимер-носителя использовали производные полисахаридов – модифицированную Na-КМЦ (молекулярная масса  $12000 \pm 500$  Да и степенью замещения по карбоксиметильным группам  $\gamma=0,85$ ) для получения “Биофтизоэтам-К” и модифицированную ПГК (молекулярная масса  $16000 \pm 500$  Да) для получения “Биофтизоэтам-П”. Химические структуры полученных полимерных комплексов показаны на рисунке 1.

В настоящей работе приведены результаты исследования медико-биологических свойств полимерных противотуберкулёзных комплексов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П”.



**Рисунок 1.** Химические структуры препаратов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П”.

\* - адресат для переписки

## МЕТОДИКА

## Определения острой токсичности

Острую токсичность и клиническую картину интоксикации исследовали на белых беспородных мышцах (n=25) массой 18-20 г обоего пола. Препараты вводили в 1 и 3%-ных концентрациях (в зависимости от дозы) однократно натошак внутрибрюшинно. Действие препаратов оценивали по изменению поведенческих реакций, общему состоянию и гибели животных за 4 ч и в течение 14 дней после введения препаратов. Результаты экспериментов обрабатывали методом вариационной статистики. Расчёты ЛД<sub>50</sub> производили по методу Литчфильда и Уилкоксона.

## Определение бактериостатической активности

Бактериостатическую активность препаратов в условиях *in vitro* определяли на вирулентных штаммах микобактерий туберкулеза H37Rv, Bovinus-8. Тесты проведены методом абсолютных концентраций с содержанием препаратов в среде Левенштейна-Йенсена в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл. Опыты *in vivo* проводили на 20 морских свинках массой 350-1100 г и 16 кроликах породы «шиншилла» массой 2,5-3,0 кг, инфицированных вирулентными штаммами микобактерии туберкулеза «Humanis NQ 2520».

## Фармакокинетика

Фармакокинетические исследования проводили на беспородных белых крысах-самцах средней массой 200±20 г. В качестве контрольных препаратов вводили перорально изониазид в дозе 17 мг и этамбутол в дозе 28 мг на крысу. «Биофтизоэтам-К» и «Биофтизоэтам-П» вводили, исходя из содержания действующих веществ, растворённых в воде. Концентрацию изониазида и его метаболита ацетилизониазида определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub> (3×100 мм). Этамбутол определяли спектрофотометрическим методом [3]. Расчёты фармакокинетических параметров проводили по программе Borgia [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования острой токсичности полимерных комплексов «Биофтизоэтам-К» и «Биофтизоэтам-П» приведены в таблице 1.

Таблица 1. Состав противотуберкулёзных препаратов и полимерных комплексов «Биофтизоэтам-К» и «Биофтизоэтам-П» и значения ЛД<sub>50</sub>.

Состав	Содержание изониазида		Содержание этамбутола		ЛД <sub>50</sub> мг/кг
	в %	в моль %	в %	в моль %	
Изониазид	100	100	-	-	224 (160÷300)
Этамбутол	-	-	100	100	1290 (1100÷1500)
КМЦ-изониазид	14,1	21,2	-	-	2860 (2560÷3000)
ПГК-изониазид	15,5	25,5	-	-	3500 (3000÷4200)
КМЦ-этамбутол	-	-	27,8	26,9	3600 (3200÷4300)
ПГК-этамбутол	-	-	28,9	28,2	3650 (3300÷4200)
«Биофтизоэтам-К»	14,1	21,2	26,4	25,4	3500 (3000÷4200)
«Биофтизоэтам-П»	15,5	25,5	29,6	28,8	3500 (3000÷4200)

Как видно из таблицы 1, острая токсичность полимерных комплексов намного ниже, чем у низкомолекулярных аналогов, в частности ЛД<sub>50</sub> для полимерных комплексов составило более 3000 мг/кг, тогда как для изониазида 224 мг/кг и для этамбутола 1290 мг/кг.

Бактериостатическую активность полимерных комплексов «Биофтизоэтам-К» и «Биофтизоэтам-П» в условиях *in vitro* проводили на вирулентных штаммах микобактерий туберкулеза H37Rv, Bovinus-8. В качестве контрольного препарата использовали препарат «Фтизоэтам» (содержащий 0,15 г изониазида и 0,4 г этамбутола). Для определения влияния комбинации препаратов изучали активность полимерных комплексов, содержащих только один противотуберкулёзный препарат КМЦ-изониазид, ПГК-изониазид, КМЦ-этамбутол и ПГК-этамбутол.

Результаты исследований показали (табл. 2), что все исследуемые штаммы микобактерий туберкулеза сохранили чувствительность к контрольному препарату и полимерным комплексам «Биофтизоэтам-К» и «Биофтизоэтам-П». У комплексов КМЦ-изониазид и ПГК-изониазид из восьми штаммов сохранили чувствительность шесть культур, на комплекс КМЦ-этамбутол и ПГК-этамбутол пять штаммов, что указывает на то, что сочетание двух противотуберкулёзных препаратов вдоль цепи макромолекулы усиливает их ингибирующее действие на микобактерии туберкулеза. Также установлено, что их активность в условиях *in vitro* прямо зависит от содержания активных веществ в полимерных комплексах.

Бактериостатическую активность полимерных комплексов *in vivo* исследовали на 20-ти обычных морских свинках массой 350-400 г и 16-ти кроликах породы «Шиншилла» массой 2,5-3,0 кг с вирулентными штаммами микобактерии туберкулеза «Humanis NQ 2520». В качестве контроля использовали изониазид в дозе 10 мг/кг, а полимерные комплексы «Биофтизоэтам-П» и «Биофтизоэтам-К» вводили, исходя из содержания действующих веществ. Препараты вводили перорально, после 21 дня заражения животных штаммом микобактерии туберкулеза «Humanis NQ 2520».

Активность препаратов оценивали по индексу поражения внутренних органов, которую определяли по методу Р. Войтека (поражению селезёнки):

$$ИС = \frac{МС \times 100\%}{МТ},$$

где: ИС – индекс селезёнки, МС – масса селезёнки, МТ – масса тела.

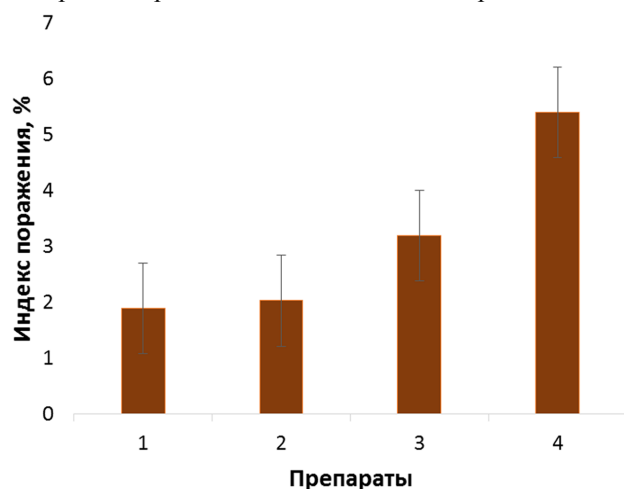
Таблица 2. Чувствительность микобактерий туберкулеза к полимерным комплексам.

Полимерные комплексы	Содержание		Штаммы МБТ							
			H37Rv				Bovinus-8			
	Изониазид, %	Этамбутол, %	646	824	831	956	806	743	552	765
Контроль*	27,3	72,7	+	+	+	+	+	+	+	+
Биофтизоэтам-К	14,1	26,4	+	+	+	+	+	+	+	+
Биофтизоэтам-П	15,5	28,6	+	+	+	+	+	+	+	+
КМЦ-изониазид	14,1	-	+	-	-	+	+	+	+	+
ПГК-изониазид	15,5	-	+	-	-	+	+	+	+	+
КМЦ-этамбутол	-	26,8	+	-	-	+	+	+	+	-
ПГК-этамбутол	-	28,9	+	-	-	+	+	+	+	-

Примечание: + - чувствителен; - - устойчив; \* - “Фтизоэтам”.

Результаты показали, что “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” проявляют выраженную противотуберкулёзную активность. Так, индекс поражения селезенки у контрольных животных равен 5,4%, при введении изониазида – 3,2%, а при введении “Биофтизоэтам-К” – 2,03% и “Биофтизоэтам-П” – 1,9% (рис. 2). Существенных изменений во внутренних органах при введении изониазида и полимерных препаратов не наблюдалось.

Динамику высвобождения лекарственных веществ из полимерных комплексов изучали в воде и модельных биологических средах: физиологический раствор и растворы, pH которых равны 2 (соответствует pH желудочного сока) и 7,2 (соответствует pH кишечника) при 37°C. Количество высвобожденного лекарства определяли методом УФ-спектроскопии.



**Рисунок 2.** Индекс поражения селезенки. 1 - “Биофтизоэтам-П”, 2 - “Биофтизоэтам-К”, 3 - изониазид, 4 - контроль.

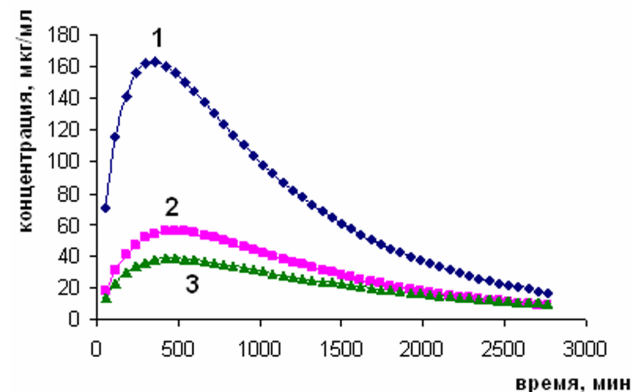
Результаты показали, что высвобождение ионно-связанного этамбутола из полимерных комплексов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” идёт преимущественно в кислой среде, что объясняется разрушением полимерного комплекса вследствие смещения равновесия при комплексообразовании в обратную сторону и подавлением диссоциации поликислоты в кислых средах. На начальных стадиях процесса из полимерного комплекса выделяется большое количество лекарственного вещества в раствор из поверхностных слоёв полимерного комплекса. Далее количество выделяющегося

лекарственного вещества из полимерных комплексов постепенно снижается, и этот процесс протекает длительное время, что свидетельствует о наличии пролонгации действия данных лекарственных веществ.

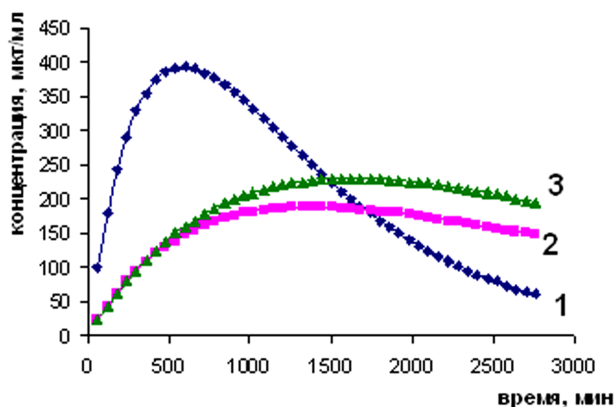
Исследование кинетики высвобождения изониазида, связанного азометиновой связью, из полимерных комплексов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” показало, что его высвобождение преимущественно идёт в кислой среде, что и следовало ожидать, так как азометиновая связь (Шиффово основание) легче гидролизуется в кислой среде, чем в щелочной среде, где высвобождение изониазида намного ниже.

Изучение кинетики выведения изониазида, ацетилизониазида и этамбутола с мочой показало, что при введении комплексов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” происходит снижение выведения изониазида, ацетилизониазида и этамбутола с мочой в сравнении с введёнными чистыми препаратами (рис. 3-5), что указывает на пролонгированное действие данных препаратов.

При введении “Биофтизоэтам-П” и “Биофтизоэтам-К” наблюдается уменьшение образования терапевтически неактивного ацетилизониазида. Выход ацетилизониазида с мочой после введения чистого изониазида к концу наблюдения составил 4,93 мг – 29,3%, после введения “Биофтизоэтам-К” составил 1,82 мг – 10,7%, при введении “Биофтизоэтам-П” составил 0,73 мг – 4,3%.



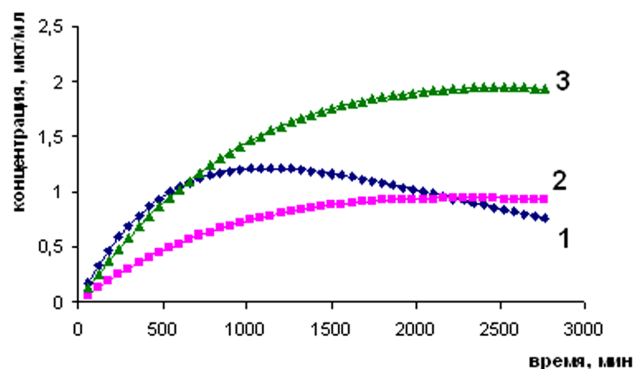
**Рисунок 3.** Динамика элиминации изониазида при введении: 1 - изониазид, 2 - “Биофтизоэтам-К”, 3 - “Биофтизоэтам-П”.



**Рисунок 4.** Динамика элиминации ацетилизониазида при введении: 1 - изониазид, 2 - "Биофтизоэтам-К", 3 - "Биофтизоэтам-П".

На основе полученных данных по элиминации изониазида и этамбутола с мочой из организма крыс проведены расчёты фармакокинетических параметров для синтезированных препаратов в программе Borgia. Результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Из данных по кинетике элиминации изониазида и этамбутола, введённых в виде полимерных производных следует, что в обоих препаратах период полувыведения увеличивается как для изониазида, так и для этамбутола. Скорость элиминации уменьшается, особенно при введении "Биофтизоэтам-К". Увеличивается



**Рисунок 5.** Динамика элиминации этамбутола при введении: 1 - изониазид, 2 - "Биофтизоэтам-К", 3 - "Биофтизоэтам-П".

период полуабсорбции для изониазида и для этамбутола при введении препаратов, уменьшается скорость абсорбции. Для этамбутола равновесная максимальная концентрация не меняется, для изониазида и его модифицированных форм равновесная максимальная концентрация уменьшается на 73% для "Биофтизоэтам-П" и на 84% для "Биофтизоэтам-К".

Общий клиренс у синтезированных препаратов для изониазида в случае "Биофтизоэтам-П" увеличивается на 147%, в случае "Биофтизоэтам-К" уменьшается на 43%. Для этамбутола общий клиренс

**Таблица 3.** Фармакокинетические параметры свободного изониазида и изониазида, диссоциированного из полисахаридной матрицы.

Фармакокинетические параметры	Изониазид	Изониазид-«Биофтизоэтам-П»	Изониазид-«Биофтизоэтам-К»
Период полуабсорбции $T_{1/2}(K_a)$ , мин	108,281	175,221	133,397
Период полувыведения $T_{1/2}(K_{el})$ , мин	693,000	742,765	1079,428
Константа абсорбции $K_a$	0,0064	0,00396	0,0052
Константа скорости элиминации $K_{el}$	0,001	0,00093	0,00064
Период полудостижения равновесной концентрации $T_{1/2} C_{ss} \max$ , мин	0,29	0,341	0,258
Равновесная концентрация $C_{ss} \max$ , мкг/мл	0,426	0,117	0,069
Объём распределения $V_d$ , мл	2173,902	5763,528	1939,269
Общий клиренс $Cl_t$ , мл/мин	2,174	5,377	1,245
Площадь под кривой «концентрация-время» AUG	230001,2	92982,2	80319,8

**Таблица 4.** Фармакокинетические параметры свободного этамбутола и этамбутола, диссоциированного из полисахаридной матрицы.

Фармакокинетические параметры	этамбутол	этамбутол-«Биофтизоэтам-П»	этамбутол-«Биофтизоэтам-К»
$T_{1/2}(K_a)$ , мин	468,243	959,834	1022,124
$T_{1/2}(K_{el})$ , мин	1420,082	2887,5	3253,521
$K_a$	0,00148	0,00072	0,00068
$K_{el}$	0,00049	0,00024	0,00021
$T_{1/2} C_{ss} \max$ , мин	0,366	0,366	0,364
$C_{ss} \max$ , мкг/мл	0,001	0	0,001
$V_d$ , мл	47559,3	305574,319	153480,475
$Cl_t$ , мл/мин	23,209	73,338	32,691
AUG	4308,7	6817,8	15294,6

у синтезированных препаратов увеличивается, в большей степени у “Биофтизоэтам-П”. Подобная разница в величине клиренса, возможно, связана с большей биодоступностью препарата на основе полигалактуроновой кислоты.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что макромолекулярные комплексы “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П”, обладая выраженным противотуберкулёзным действием, менее токсичны, чем немодифицированные изониазид и этамбутол.

Результаты фармакокинетических исследований показали, что при введении полимерных препаратов “Биофтизоэтам-К” и “Биофтизоэтам-П” терапевтическая концентрация активных веществ (изониазида и этамбута) в крови сохраняется дольше, чем у их низкомолекулярных аналогов. Введение изониазида в полисахаридную матрицу замедляет его метаболизм в терапевтически неактивный ацетилизониазид. Полученные результаты достоверно подтвердили пролонгированное действие Биофтизоэтам-П и Биофтизоэтам-К.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шомуратов Ш.А., Муродов Э.А., Тураев А.С. (2006) Химия растительного сырья, **2**, 142-146.
2. Тураев А.С., Шомуратов Ш.А., Муродов Э.А., Назиров П. (2006) Узб. хим. журн., **2**, 17-22.
3. Сливкин А.И., Селеменев В.Ф., Суховерхова Е.А. (1999) Физико-химические и биологические методы оценки качества лекарственных средств. Воронеж: ВГУ, 215-218.
4. Laboratory of Applied Pharmacokinetics (1995) USC\*Pack P.C. Collection Clinical Research Programs. Los Angeles. University of Southern California. School of Medicine. Version **10.7**.
5. Svensson J., Muchtar A., Ericsson O. (1985) J. Chromatogr., **341**, 193-197.

Поступила: 23. 04. 2014.  
Принята к печати: 08. 08. 2014.

## MEDICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYSACCHARIDE COMPLEX OF ISONIAZID AND ETHAMBUTOL

*Sh.A. Shomurotov<sup>1</sup>, G. Mamadullaev<sup>2</sup>, A.S. Turaev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of Republic Uzbekistan,  
83 Mirzo Ulugbek str., Tashkent, Uzbekistan; e-mail: ibchem@uzsci.net

<sup>2</sup>Uzbek Scientific Research Institute of Veterinary Science,  
Samarkand region, Uzbekistan; e-mail: uzniiiv@rol.uz

The polymeric anti-tubercular drug systems "Biophthizoetham-K" and "Biophthizoetham-P" have been obtained by chemical modification of parent compounds isoniazid and ethambutol with carboxymethylcellulose and polygalacturonic acid. These systems were less toxic than the parent compounds; they exhibited prolonged anti-tubercular action at a dose sixfold lower than isoniazid. Pharmacokinetic studies have shown that after administration of "Biophthizoetham-K" and "Biophthizoetham-P", therapeutic concentration of active substances (isoniazid and ethambutol) in blood remained longer than after administration of active substances alone. Introduction of isoniazid in the polysaccharide matrix decreased its metabolism into the therapeutically inactive form – acetylisoniazid.

**Key words:** carboxymethylcellulose, polygalacturonic acid, polymer-drug-deliver, tuberculosis, prolongation