

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства [Текст] : пособие для врачей / М. Д. Машковский. - 16-е изд., перераб., испр. и доп. - Москва: Новая волна: Изд. Умеренков, 2012. - 1216 с.
2. Усов, К. И. Острая токсичность противотуберкулезных препаратов, содержащих и не содержащих пиридоксина гидрохлорид (экспериментальное исследование) / К. И. Усов, Г. Г. Юшков, А. В. Машанов // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 12. – С. 76-82.

УДК 615.9

Усов Константин Ильич,

к.б.н., доцент, доцент кафедры «Экология и безопасность деятельности человека»,
ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет»,
e-mail: konstausov@ya.ru

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ БЕЗОПАСНОСТИ
ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА «РИФАБУТИН» ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ВВЕДЕНИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

Usov K.I.

**TOXICOLOGICAL SAFETY PROFILE ANTI-TUBERCULOSIS DRUG «RIFABUTIN»
WITH PROLONGED ADMINISTRATION UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS**

Аннотация. Статья посвящена экспериментальному исследованию по определению токсикологического профиля безопасности противотуберкулезного препарата «Рифабутин» при длительном введении экспериментальным животным.

Ключевые слова: рифабутин, токсичность, переносимость, профиль безопасности препарата.

Abstract. The article is devoted to an experimental study to determine the toxicological safety profile of the anti-tuberculosis drug «Rifabutin» with prolonged exposure to experimental animals.

Keywords: rifabutin, toxicity, tolerability, safety profile of the drug.

Рифабутин это полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, ансамицин. Эффективен в отношении внутриклеточно и внеклеточно расположенных микроорганизмов. Селективно подавляет ДНК-зависимую РНК-полимеразу бактерий. Оказывает бактерицидное действие. Высокоактивен в отношении *Mycobacterium* spp. (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, в т.ч. расположенных внутриклеточно) и др. атипичных микобактерий. От 1/3 до 1/2 штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, резистентных к рифампицину, чувствительны к рифабутину, что указывает на неполную перекрестную резистентность между этими антибиотиками. Активен также в отношении многих грамположительных микроорганизмов. При монотерапии быстро развивается устойчивость [1,3,4].

Учитывая результаты однократного внутривенного введения растворимой формы Рифабутина [2], а также рекомендации и требования нормативных документов, была составлена программа дальнейших исследова-

ний препарата «Рифабутин» для внутривенного введения.

В качестве экспериментальной биологической модели в эксперименты были выбраны кролики, как наиболее удобный вид для изучения препаратов, предназначенных для внутривенного введения.

Применяли два пути введения препарата: внутривенно, внутрижелудочно (капсулы). Обследование включало в себя: фон; 1, 3, 7, 11 сутки от начала введения. Гистологические, морфологические исследования осуществляли на 12 день введения. Применяли следующие дозы исследуемого препарата: 1,4 мг/кг – растворимая форма; 5 мг/кг – растворимая форма, 5 мг/кг – капсулы; 50 мг/кг – растворимая форма, 50 мг/кг – капсулы. Срок ежедневного введения – 12 дней. Контроль интактный. Контроль позитивный (равное по объему введение физиологического раствора). Группы животных: для введения растворимой формы (самцы – 10 в каждой группе, самки – 10 в каждой группе). Для введения капсульной формы (самцы – 10 в

каждой группе, самки – 10 в каждой группе). Контроль интактный: самцы – 10, самки – 10. Контроль позитивный: самцы – 10, самки – 10.

Регистрировали общее состояние – масса тела, температура тела, потребление воды. Частота сердечных сокращений по ЭКГ во II ст. отведения. Определяли гематологические, биохимические показатели [1, 2]. Оценивали морфологию внутренних органов с оценкой раздражающего действия, осуществляли гистохимическое исследование печени по выбранным показателям [1,2].

Масса тела животных, получавших растворимую форму Рифабутина в дозе 50 мг/кг, в процессе ежедневных введений постепенно снижалась, но не в той мере соответствия ухудшению состояния кроликов, отказу их от корма и потребления воды.

Начиная с четвертых суток введения у некоторых животных, появилась одышка. Угрожающее состояние организма животных потребовало снижения дозы до 25 мг/кг (с пятых суток), однако один кролик (самец) погиб на 6 сутки от остановки дыхания и сердечной деятельности, на вскрытии – тромбоз легочной артерии. Еще один кролик в аналогичном состоянии был возвращен к жизни реанимационными мероприятиями (закрытый массаж сердца) и перенес еще три введения препарата.

Введение препарата в дозах 5 мг/кг и 1,4 мг/кг не привело к существенному изменению прироста массы тела животных.

Динамика отличия от контроля по величине потребляемой кроликами воды была более отчетлива у животных группы, получавшей препарат в дозе 50 мг/кг, количество же выделяемой кроликами мочи было ниже ожидаемого.

При внутрижелудочном введении капсульной формы Рифабутина в дозе 50 мг/кг тоже отмечено снижение массы тела и несколько более выраженное. Препарат, введенный в дозе 5 мг/кг, не вызвал отличий в приросте массы тела от контроля, однако один кролик из этой группы погиб на 7 сутки от пневмонии.

Отличия от контроля в потреблении воды и выделении мочи даже в группе животных, получавших препарат в дозе 50 мг/кг, были меньше, чем при внутривенном введении растворимой формы Рифабутина.

Температура тела животных, получавших растворимую форму Рифабутина в дозе

50 мг/кг (с 6 суток – 25 мг/кг), на сроках наблюдения 7 и 11 сутки оказалась несколько повышенной, чего не отмечено при пероральном введении капсульной формы препарата в той же дозе. У животных, получавших сравнимые препараты в меньших дозах, отличий от контроля не обнаружено.

У животных, получавших внутривенно растворимую форму Рифабутина в дозе 50 мг/кг (с 6 суток – 25 мг/кг), постепенно повышалась частота сердечных сокращений, достигнув максимума к 11 суткам наблюдения, сопровождавшаяся снижением вольтажа зубца R. У животных, получавших Рифабутин перорально в той же дозе, электрокардиограмма была практически такой же. Препарат в растворимой форме, но в дозе 1,4 мг/кг, несколько снизил частоту сердечных сокращений.

В результате анализа гематологических показателей у животных на первые сутки после введения сравнимых образцов препарата принципиальных отличий от контроля не обнаружено. В то же время следует отметить некоторые тенденции в реакции системы крови: при введении растворимой формы Рифабутина несколько снизилось содержание гемоглобина и эритроцитов, хотя среднее содержание гемоглобина в одном эритроците осталось неизменным; количество тромбоцитов незначительно снизилось, но тромбоцитокрит и средний объем тромбоцитов не изменились; несколько сократилось количество лейкоцитов. При введении капсульной формы препарата количество гемоглобина и эритроцитов обрело тенденцию к повышению, количество же тромбоцитов уменьшилось еще отчетливей, а количество лейкоцитов даже возросло. Отмеченные изменения не достигали статистической значимости даже при введении препаратов в дозе 50 мг/кг, а колебания показателей происходило в основном в пределах физиологической нормы, как у самцов, так и у самок.

На третьи сутки после воздействия растворимой формой Рифабутина в дозе 50 мг/кг снижение содержания гемоглобина и эритроцитов достигло статистически достоверных отличий от контроля, количество тромбоцитов существенно возросло, как и количество лимфоцитов. При внутрижелудочном введении капсульной формы препарата содержание гемоглобина и эритроцитов оставалось высоким, а тромбоцитов несколько пониженным, содержание лейкоцитов –

повышенным.

К седьмым суткам состояние отдельных животных по гематологическим показателям ухудшилось (при введении растворимой формы препарата в дозе 50 мг/кг) с той же направленностью отличий от контроля. Один кролик погиб. При пероральном введении капсульной формы препарата в дозе 50 мг/кг отмечено некоторое снижение количества эритроцитов, содержание гемоглобина снизилось до контрольного уровня. Количество тромбоцитов оставалось ниже контроля.

Неблагоприятное сочетание изменений гематологических показателей потребовало снижения дозы растворимой формы препарата до 25 мг/кг.

Снижение дозы привело к некоторому улучшению состояния животных по гематологическим показателям, однако содержание гемоглобина и эритроцитов в крови все же оставалось ниже контрольного уровня, но в пределах физиологической нормы, количество тромбоцитов превышало контроль.

Капсульная форма препарата в дозе 50 мг/кг к одиннадцатым суткам не привела к существенному ухудшению состояния животных.

Следует отметить и то, что обе формы препарата, вводимые в дозе 5 мг/кг не вызвали принципиально значимых изменений гематологических показателей, лишь количество лейкоцитов несколько превышало контрольный уровень.

В процессе многократного внутривенного введения растворимой формы Рифабутина кроликам в дозе 50 мг/кг уже на первые сутки обследования несколько неожиданно произошло снижение содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови до статистически значимых отличий от контроля, но в пределах допустимых физиологических значений, причем этот феномен повторился при пероральном введении капсульной формы препарата. В последующие сроки обследования вышеотмеченные показатели постепенно в цифровых значениях приблизились к контролю даже на фоне продолжающегося введения препаратов.

Признаков отчетливого повреждающего действия Рифабутина на углеводный обмен (по содержанию глюкозы в сыворотке) не обнаружено. Содержание общего белка в сыворотке крови животных при введении растворимой формы препарата несколько снизилось, а при введении капсульной не-

сколько повысилось и тоже в пределах допустимых колебаний показателя. Более существенные изменения установлены по показателю содержания общего холестерина в сыворотке: уже с первых суток после введения сравниваемых образцов препарата намечалось клинически значимое снижение величин показателя. При этом уменьшение дозы растворимой формы препарата способствовало восстановлению показателя, а при введении капсульной формы цифровые величины показателя оказались значимо ниже контроля.

Содержание печеночных ферментов в сыворотке крови отличалось некими особенностями: всплеск содержания аланинаминотрансферазы на первые сутки до статистически и клинически значимых величин сменился в дальнейшем на уровень, соответствующий контролю, это оказалось характерным для обоих образцов препарата, но более выражено у капсульной формы. Для аспаргатаминотрансферазы оказалось свойственным некоторое снижение содержания на третьи сутки с последующим повышением.

Даже при многократном введении местных изменений тканей, могущих быть квалифицированы как результат раздражения, не обнаружено.

Устанавливалась реакция специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ). В данном случае (при введении препарата в рабочей дозе 0,1 % в объеме 0,1 мл) величина РСЛЛ составила $11 \pm 0,8$ %; при введении препарата в рабочей дозе 0,01 % в объеме 0,1 мл величина РСЛЛ составила $8 \pm 0,6$ %.

Величина РСЛЛ существенно не менялась при использовании, как крови животных, так и человека. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии у образца растворимой формы Рифабутин сенсibiliзирующих свойств (предел допустимости – 10 %).

При патоморфологическом исследовании крыс было установлено, что контрольные и подопытные животные по внешнему виду значительно отличались друг от друга. Часть животных, получавших внутрижелудочно токсическую дозу на уровне 5,0 г/кг массы тела, выглядела очень слабой и погибала в течение первых часов при явлениях пониженной подвижности, безразличия к пище с клонико-тоническими судорогами. На вскрытии макроскопически у части животных - серозный экссудат в брюшной и тран-

судат в грудной полости. Лёгкие - спавшиеся, серого цвета, все внутренние органы окрашены в цвет препарата – фиолетовый. Полость желудка наполнена густым содержимым, окрашенным в цвет препарата. Следует особо обратить внимание на то, что оболочки мозга и кора были окрашены препаратом.

У животных, переживших острое отравление или подвергавшихся воздействию более низких доз, через 3-5 суток шерстный покров выглядел блестящим и опрятным. Выделений из естественных отверстий нет. Нарушений скелета нет. Зубы сохранены. Видимые слизистые – блестящие, гладкие. Молочные железы самок – без особенностей. Положение внутренних органов – без особенностей. Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы – без особенностей. Щитовидная железа – обычной формы, цвета и плотности, на разрезе – однородно розовая. Тимус – треугольной формы, умеренно плотной консистенции. Аорта – без особенностей, интима – гладкая, блестящая. Мышца сердца – умеренно плотная, равномерной коричневой окраски. Клапаны – гладкие, блестящие. В желудочках – небольшое количество жидкой крови. Величина и форма спавшихся легких – без особенностей, просвет трахеи и крупных бронхов свободны. Слизистая пищевода – блестящая, гладкая. Величина и форма желудка – без особенностей. Гиперемии, эрозий, кровоизлияний слизистой не отмечено. Состояние кишечника – без особенностей. Форма и величина печени – без особенностей. На разрезе паренхима – темно-красного цвета, умеренно зернистая. Поджелудочная железа – дольчатая, умеренно плотная. Селезенка – обычной формы и размеров, на разрезе – сероватые мелкоклеточные фолликулы. Почки – без особенностей: капсула легко снимается, поверхность – гладкая, однородного цвета, на разрезе видимых признаков патологии не отмечено. Надпочечники – округлой формы, умеренно плотны, бело-желтого цвета. Слизистая мочевого пузыря – гладкая, блестящая, оставшаяся моча – прозрачная, светлая. Яичники самок – зернистые, темно-красного цвета, матка – обычных размеров. Семенники самцов – обычных размеров, цвета и консистенции. Головной мозг окрашен в фиолетовый цвет, несколько отёчен. Таким образом, по данным вскрытия у павших или забитых в агональном состоянии животных отмечаются выраженные изменения в головном мозге,

лёгких и желудке. В то же время, у животных, переживших острое отравление, видимых макроскопических изменений со стороны мозга, лёгких отличий от контроля после введения препарата в испытанных дозах не установлено.

При микроскопическом исследовании у павших или умертвленных в агональном состоянии животных, которым вводили в/желудочно препарат в дозах от 1,25 до 5,0 г/кг массы тела, выявлен ряд морфологических изменений внутренних органов: в лёгких - межальвеолярные капилляры переполнены элементами крови, отмечается их проникновение в полость альвеол. В печени - полнокровие магистральных сосудов с участками застойного полнокровия синусоидов. В почках - выраженные признаки белковой дистрофии эпителия канальцев практически во всех отделах нефрона. В сердце - миофибриллы мышцы сердца равномерно окрашены без признаков белковой дистрофии, отмечаются явления отёчности мышечных волокон. В желудке - эпителий пищеводной части не изменён, в железистом отделе встречаются участки с проявлениями белковой дистрофии, вплоть до очагов некроза. В кишечнике - эпителий ворсинок тонкого и толстого кишечника – в пределах нормы. Мозг - выраженный перичеселлюлярный и периваскулярный отёк в области коры, гиперхроматоз ядер нейронов.

У животных, получивших препарат в растворимой форме внутрибрюшинно, изменений слизистой желудка и кишечника не установлено.

У животных, переживших острое отравление растворимой формой препарата, микроскопически на 5 сутки выявлены лишь незначительные морфологические изменения внутренних органов: в печени - умеренно выраженные проявления белковой дистрофии в гепатоцитах, вплоть до баллонной. Эпителий желчных протоков - без изменений, воспалительные инфильтраты отсутствуют, полнокровия сосудов и синусоидов не отмечено. Эпителий ворсинок тонкого и толстого кишечника – в пределах нормы. В лёгких - отмечаются очаги с утолщенной межальвеолярной перегородкой, полнокровие капилляров и выход эритроцитов в просвет альвеол. В почках – встречаются участки с расширенным просветом канальцев проксимального отдела нефрона, обращает внимание сморщивание сосудистых петель маль-

пигментных телец с увеличением просвета между боуменовской капсулой и сосудистым клубочком. В сердце – цитоплазма миофибрилл равномерно окрашена, мышечные пучки расположены компактно. В мышцах левого желудочка встречаются участки застойного полнокровия мелких сосудов и капилляров. Желудок – слизистая отёчная, между ворсинками выраженные пустоты, эпителий уплощен. Мозг – выявлены умеренно выраженные проявления белковой дистрофии в нейронах, проявления перичеселлюлярного и периваскулярного отёка.

При гистохимическом исследовании отмечено снижение активности СДГ на 2 балла, увеличение содержания липидов и снижение содержания гликогена.

То же при исследовании кроликов. Макроскопически: при внутривенном введении препарата в дозе 50 мг/кг наблюдалась гибель одного животного в результате тромбоза магистральных сосудов сгустками крови: так, при вскрытии встречались сгустки крови в лёгочной артерии и в левом желудочке сердца. При этом клиническая картина характеризовалась явными признаками гипоксии.

Как при в/желудочном, так и при в/венном воздействии на вскрытии все органы были окрашены в фиолетовый цвет.

Внутренние органы макроскопически по внешнему виду не отличались от контроля. Микроскопически: у животных, получивших капсульную форму препарата, в желудке: в эпителии ворсинок железистой части желудка встречаются участки эрозий. Эпителий ворсинок толстого кишечника – в пределах нормы. Печень: проявления белковой дистрофии гепатоцитов, участки застойного полнокровия магистральных сосудов и синусоидов, увеличение единичных лимфоцитов в паренхиме печени. В почках отмечается увеличение просвета в извитых канальцах проксимального отдела нефрона и наличие белковых цилиндров в просвете собирающих канальцев. Морфологическая структура мышцы сердца, лёгких, селезёнки и других органов не отличались от контроля. При воздействии в меньших дозах препарата (5,0 и 1,4 мг/кг) при внутривенном введении изменений не выявлено. Слизистая желудка при этом не была повреждена. При гистохимическом исследовании в печени при воздействии препаратом в дозе 50 мг/кг обращает на себя внимание значительное увеличе-

ние содержания общих липидов, снижение содержания гликогена и активности СДГ на 2 балла, увеличение активности ЩФ до 3 баллов. При воздействии препаратом в дозах 5 и 1,4 мг/кг гистохимические показатели были в пределах контроля.

Отличительной особенностью модели с введением растворимой формы препарата внутривенно, даже в дозе 50 мг/кг, является отсутствие морфологических признаков повреждения слизистой желудочно-кишечного тракта.

В результате проведенных экспериментальных исследований с использованием биологических моделей установлены параметры острой токсичности растворимой формы препарата Рифабутин при его внутрибрюшинном введении мышам: мыши (самцы) $DL_{50} = 1500 \pm 150$ мг/кг; мыши (самки) $DL_{50} = 1633 \pm 150$ мг/кг. Животные линии BALB/c. При введении препарата нелинейным животным отличий в параметрах токсичности не получено. Установить параметры острой токсичности на крысах не удалось в силу невозможности совмещения высоких доз препарата с допустимым объемом жидкости для ее внутрибрюшинного введения, однако минимально смертельная доза как для мышей, так и для крыс оказалась практически одинаковой 800–900 мг/кг. Для сравнения крысам-самцам линии Вистар вводилась внутривенно капсульная форма препарата: $DL_{50} = 2917 \pm 217$ мг/кг. Сравнение касалось преимущественно клиники острого отравления, в основе которой, как при внутрибрюшинном введении растворимой формы препарата, так и при внутривенном – капсульной, лежали проявления поражения нервной системы: снижение двигательной активности, шаткая походка, некая характерная поза. У животных, переживших острый период, сравнительно быстро восстанавливались обычные поведенческие реакции. Следует отметить и то обстоятельство, что на вскрытии погибших или агонирующих животных через 60 мин. все органы были окрашены в цвет препарата, в т.ч. и оболочки головного мозга. Морфологически во внутренних органах установлены гемодинамические и дистрофические изменения, характерные для токсического стресса и тканевой гипоксии. В то же время при введении животным препарата, как в растворимой, так и нерастворимой форме, в дозах ниже 500 мг/кг однократно отчетливых при-

знаков острого отравления не отмечено. Не отмечено и явлений раздражения слизистых глаза кроликов при нанесении на конъюнктиву как растворимой, так и нерастворимой формы (последней в виде нативного препарата, так и отфильтрованной взвеси). Не выявлено и сенсибилизирующего действия препарата несмотря на то, что в его составе содержится 3 % человеческого альбумина. Сенсибилизирующее действие выявлялось применением реакции специфического лизиса лейкоцитов и теста опухания уха. Не установлено раздражающего действия растворимой формы препарата и в месте даже многократного внутривенного введения. Не отмечено и аллергических реакций у исполнительского состава, хотя по фиолетовому цвету препарата можно было судить о фактах попадания препарата на кожу.

В процессе многократного внутривенного введения растворимой формы препарата Рифабутин получены данные, могущие представлять и практический интерес. Так, при введении препарата в дозе 50 мг/кг уже с четвертых суток введения состояние животных потребовало снижения дозы до 25 мг/кг (у кроликов появилась одышка, нарушение сердечной деятельности). Одновременно ухудшалось состояние животных и по таким интегральным показателям как прирост массы тела, потребление воды и корма. Отнести это к превышению объема внутривенно вводимой жидкости нельзя, поскольку контрольные животные получали столько же без каких-либо внешних проявлений патологии (объем жидкости не превышал 10 мл/кг). При этом следует отметить факт развития похожих признаков и даже в большей мере при внутрижелудочном введении препарата в той

же дозе. За небольшим исключением (температура тела) динамика показателей общего состояния животных при введении сравнимых образцов препарата была практически одинаковой.

Изменения гематологических показателей соответствовали состоянию химического стресса разной степени выраженности. Снижение дозы привело к отчетливому улучшению состояния животных. Это представляет теоретический интерес. Гораздо важнее то, что препарат в дозах 5 и 1,4 мг/кг не вызвал принципиальных отличий от контроля.

Из биохимических показателей в клинической практике следует обратить внимание на снижение содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови в начале курса введения и на содержание холестерина в процессе лечения. Снижение содержания холестерина может быть связано с токсическим поражением печени, легких, почек, что в той или иной мере подтверждается морфологически и динамикой содержания печеночных ферментов в сыворотке крови. В целом же, проявления изменений гематологических и биохимических показателей не слишком соответствовали общему состоянию животных и их поведению. Снижение дозы выравнивало это соотношение. И в случае длительного внутривенного введения растворимой формы препарата и внутрижелудочного – капсульной в дозе 5,0 мг/кг, а, тем более, 1,4 мг/кг признаков развития патологии не отмечено ни клинически, ни морфологически, что позволило рекомендовать препарат для следующих этапов исследования в целях его государственной регистрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усов, К.И. Современная фармакотерапия туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью / К. И. Усов // Современные технологии и научно-технический прогресс. – 2022. – № 9. – С. 285-286.
2. Усов, К.И. Острая токсичность противотуберкулезных препаратов, содержащих и не содержащих пиридоксина гидрохлорид (экспериментальное исследование) / К. И. Усов, Г. Г. Юшков, А. В. Машанов // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 12. – С. 76-82.
3. Bruglera M., Scampini Q., Newman A. et all. Overview of toxicological data on rifabutin / Exp.Toxicol Pathol, 1995 jan:47(1): P.1–9.
4. Furet J. Hepatite mixte a la rifamycine SV. A propos d'un CAS // Therapie. –1986 – Vol.41, №5.–P.405–406.