

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИННОВАЦИОННОГО ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО АНТИДОТА ЦИАНИДОВ НА ОСНОВЕ СМЕШАННОЙ КОБАЛЬТОВОЙ (2+) СОЛИ МЕРКАПТОУКСУСНОЙ И ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТ

Баландин Н.В.¹, Ковтун В.Ю.¹, Гладких В.Д.¹, Мелихова М.В.²

¹ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, г. Химки Московской обл.(141402, Московская обл. г. Химки, Васьютинское шоссе, д.11), e-mail: info@atompharm.ru

²ФГБУН Институт токсикологии ФМБА России, г. Санкт-Петербург (141402, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1), e-mail: info@rihope.ru

Обсуждаются результаты доклинической оценки безопасности потенциального лечебно-профилактического антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2⁺) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот. В опытах на белых крысах и кроликах при внутрижелудочном введении показано, что тестируемый препарат по параметрам острой токсичности относится к IV классу малотоксичных лекарственных веществ. Приводятся результаты фармакокинетических исследований, характеризующих особенности всасывания, распределения и элиминации тестируемого препарата при внутрижелудочном введении кроликам. Модельный образец тестируемого потенциального антидота цианидов обладает слабо выраженным кумулятивным эффектом. По критериям параметров острой и подострой токсичности пероральная лекарственная форма тестируемого препарата не имеет противопоказаний для клинических испытаний и медицинского применения.

Ключевые слова: лечебно-профилактический антидот, цианиды, смешанная кобальтовая (2⁺) соль меркаптоуксусной и пировиноградной кислот, фармакокинетика.

PRECLINICAL EVALUATION OF THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC INNOVATIVE ANTIDOTE CYANIDE BASED MIXED COBALT (2 +) SALTS MERCAPTOACETIC AND PYRUVIC ACID

Balandin N.V.¹, Kovtun V.U.¹, Gladkih V.D.¹, Melikhova M.V.²

¹«Pharmaceutical Protection», Federal Medical-Biological Agency of Russia, (141402, Khimki, Moscow region, Vashutinskoe highway, 11), e-mail: info@atompharm.ru

²«Institute of toxicology» Federal Medical-Biological Agency of Russia, (141402, Sankt-Peterburg, Bechtereva, 1), e-mail: info@rihope.ru

The results of the preclinical safety evaluation of potential therapeutic and prophylactic antidote to cyanide - based mixed cobalt (2 +) salt of mercaptoacetic acid and pyruvic . In experiments with rabbits and albino rats when administered intragastrically shown that the drug being tested for acute toxicity parameters relates to low toxicity class IV drugs. The results of pharmacokinetic studies characterizing features of the absorption, distribution and elimination of a drug test at the intragastric administration to rabbits. Model sample test potential cyanide antidote has a slightly pronounced cumulative effect . By the criteria parameters of acute and subacute toxicity of the oral dosage form of the drug test has no contraindications for clinical research and medical applications.

Keywords: therapeutic and prophylactic antidote, cyanide, mixed cobalt (2 +) salt of mercaptoacetic acid and pyruvic, pharmacokinetics.

Введение

В рамках Международной программы химической безопасности (IPCS) разработан и рекомендован к применению перечень антидотов при отравлении цианидами: амилнитрит, тиосульфат натрия, нитрит натрия, 4-диметиламинофенол, гидроксикобаломин и ЭДТА-Со²⁺. Преимущественно парентеральный путь введения, а в ряде случаев высокая токсичность существующих антидотов цианидов, стимулируют научные изыскания по разработке

малотоксичных лечебно-профилактических антидотов, предназначенных для перорального применения. В настоящей статье приводятся результаты доклинической оценки безопасности и особенностей фармакокинетики пероральной лекарственной формы лечебно-профилактического антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот.

Цель исследования – экспериментальная оценка токсичности, особенностей фармакокинетики и безопасности потенциального лечебно-профилактического антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот.

Материалы и методы исследования

При проведении исследования использовали модельный образец потенциального перорального антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот (таблетки 500 мг), синтез лекарственной формы которого осуществлён на стандартном оборудовании (технология синтеза апробирована в заводских условиях ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России).

Оценку параметров острой токсичности проводили в опытах на половозрелых лабораторных животных (ЛЖ): белых крысах и кроликах при внутрижелудочном введении.

Для определения показателей острой токсичности при внутрижелудочном введении модельный образец препарата *per os* вводили через атравматичный металлический зонд в возрастающих дозах по Литчфилду – Уилкоксону [1]. Для достижения больших доз препарата введение осуществляли повторно с интервалом 20–30 минут в течение 4 часов. Расчеты величин медианно-летальных доз (LD_{50}) проводили по В.Б. Прозоровскому, 1978 [2]. Контрольные животные получали аналогичные по объемам введения растворы воды для инъекций. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 14 дней.

Фармакокинетические исследования модельного образца препарата проводили на кроликах при внутрижелудочном введении (средняя удельная доза составляла 100 мг/кг в пересчёте на активный компонент). Кровь (1,0 мл) отбирали из краевой вены уха кролика через 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0; 6.0; 9.0; 14.0; 24.0 и 48.0 часа после введения препарата.

Учитывая, что анализ исследуемого соединения невозможен традиционными методами газо-жидкостной хроматографии, количественное определение соединения проводили по кобальту, молекулярная масса которого составляет около 1/5 молекулярной массы всей молекулы препарата. Для измерения использовали метод атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермическим способом атомизации. Предел обнаружения кобальта (3σ) в выбранных условиях составил 1,5 пг. Содержание кобальта в пробах находилось в рассчитанных доверительных границах, а методика его количественного определения в

крови не зависела от систематических ошибок. Для описания фармакокинетики образца лекарственной формы препарата использовали стандартные показатели (T_{max} – время достижения максимума концентрации; C_{max} – максимальная концентрация; AUC – полная площадь под кривой в интервале 0–48 час; MRT – среднее время удерживания; Cl-общий клиренс; V_{ss} -стационарный объем распределения; $T_{1/2}$ – период полувыведения; $T_{эфф} = AUC_{\infty}/C_{max}$ – эффективная длительность) в их условных обозначениях, принятых в литературе, расчёт которых выполнялся модельно-независимым способом посредством метода интегральных моментов.

Для оценки подострой токсичности модельного образца препарата при внутрижелудочном введении вводили кроликам в эффективной (40 мг/кг), промежуточной (200 мг/кг) и максимальной терапевтической дозах, не вызывающей гибели при однократном применении (500 мг/кг) на протяжении 5 суток. Регистрировали общее состояние, ректальную температуру, массу тела ЛЖ, потребление корма и воды, физиологические параметры, биохимические константы и данные анатомо-морфологических исследований в соответствии с требованиями нормативных документов по проведению доклинического изучения новых фармакологических веществ [3]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования

Результаты оценки острой пероральной токсичности лекарственной формы тестируемого препарата свидетельствуют, что величины LD_{50} при внутрижелудочном введении в опытах на крысах колеблются в интервалах: от 3000 ± 460 мг/кг (самцы) до 3100 ± 350 мг/кг (самки); в опытах на кроликах, соответственно - 1500 ± 120 мг/кг и 1800 ± 220 мг/кг. Данные токсикометрии, наблюдения за ЛЖ на протяжении 14 суток в постинтоксикационном периоде острого отравления, а также динамика некропсии позволяет отнести тестируемую лекарственную форму препарата к IV классу малотоксичных лекарственных веществ, для которых диапазон доз LD_{50} при внутрижелудочном введении в опытах на крысах составляет 500–5000 мг/кг [5].

Подострое внутрижелудочное введение лекарственной формы потенциального антидота цианидов кроликам обоих полов один раз в сутки в течение 5 дней в дозах 40 и 200 мг/кг не влияло на внешний вид, общее состояние и поведение животных. На максимальной дозе (500 мг/кг) у большинства кроликов отмечалась заторможенность, вялость, снижение потребления корма, воды и диарея. В восстановительный период каких-либо заметных нарушений состояния или поведения по сравнению с контролем не отмечалось.

Следует отметить, что в ходе эксперимента фиксировалась гибель подопытных животных на максимальной дозе, что свидетельствовало о наличии возможного

кумулятивного эффекта модельного образца потенциального антидота цианидов, что в дальнейшем было подтверждено экспериментально: отношение предполагаемой ЛД₅₀ при повторных введениях (2000 мг/кг) к ЛД₅₀ при однократном введении (1650 мг/кг – среднее между ЛД₅₀ кроликов самцов и ЛД₅₀ кроликов самок) составило $\approx 1,2$, что свидетельствует о слабом кумулятивном эффекте [4].

Животные, получавшие модельный образец препарата, незначительно отставали в весе на 6 сутки исследования, однако в конце периода восстановления на 28 сутки вес кроликов опытных групп практически не отличался от веса контрольных животных. Животные опытных групп во время введения препарата потребляли корм в меньшем, а воду в большем количестве, чем в контрольных группах. В восстановительном периоде кормо- и водопотребление между всеми экспериментальными группами было одинаково.

Данные измерения ректальной температуры свидетельствуют об отсутствии различий регистрируемого показателя у животных опытных и контрольных групп. Существенных изменений со стороны выделительной функции почек при введении образца антидота кроликам не наблюдалось.

Исследуемый образец антидота в дозе 500 мг/кг вызывал у кроликов достоверно значимое увеличение частоты сердечных сокращений, снижение вольтажа зубцов Р и R, а также снижение интервалов PQ и QT. Максимальные изменения наблюдались через 30–120 минут после введения антидота. На шестые сутки и в конце восстановительного периода значимые различия между контрольными и опытными группами, также как и половые различия не зафиксированы. Дозы 40 и 200 мг/кг не влияли на частоту сердечных сокращений и характер электрокардиограммы кроликов.

Следует отметить, что у подопытных животных на 6 сутки исследования не отмечалось достоверно значимых патологических гематологических изменений, кроме незначительного увеличения гематокрита и скорости оседания эритроцитов у животных, получавших дозу 500 мг/кг. На 28 день исследования достоверных отличий между показателями контрольной и опытных групп не зафиксировано, и в конце периода наблюдения периферическая кровь кроликов всех экспериментальных групп по своему количественному и качественному составу соответствовала видовой физиологической норме.

У кроликов опытных групп на дозах 40, 200 и 500 мг/кг через 5 дней непрерывного применения препарата биохимические показатели периферической крови не выходили за пределы физиологической нормы по сравнению с фоном и контролем. Исключение составлял показатель протромбинового времени, который достоверно возрастал на 6 сутки при введении 500 мг/кг. На 28 сутки исследования достоверные отличия между исследуемыми группами по всем показателям отсутствовали.

Данные вскрытия и макроскопического исследования показали, что достоверные отличия в массовых коэффициентах органов кроликов всех экспериментальных групп отсутствуют как на 6 сутки, так и на 28 сутки восстановительного периода. При просмотре гистологических препаратов органов контрольных животных и органов животных, получавших препарат в дозах 40, 200 и 500 мг/кг, после восстановительного периода (на 28 день исследования) различий между группами не обнаружено.

Таким образом, по результатам некропсии и гистологического исследования ежедневное пероральное введение лекарственной формы антидота цианидов в дозах 40, 200 и 500 мг/кг в течение 5 суток кроликам не вызывает раздражения, воспаления или деструкции тканей желудочно-кишечного тракта, а также не сопровождается развитием дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов.

Результаты проведённого исследования фармакокинетики потенциального перорального антидота цианидов при введении кроликам в дозе 100 мг/кг (табл. 1).

Таблица 1. Показатели фармакокинетики кобальта при внутрижелудочном введении лекарственной формы препарата, 100 мг

№№	Показатель								
	T _{max}	C _{max}	AUC ₄₈	AUC ₀₀	MRT	Cl	V _{ss}	T _{1/2}	T _{эфф}
	ч	мкг/мл	мкг*ч/мл	мкг*ч/мл	ч	л/кг/ч	мл/кг	ч	ч
1	1.50	64.32	862.56	955.11	15.78	98.16	1549.36	12.68	14.85
2	1.50	72.80	1356.59	1431.76	14.88	74.30	1105.43	11.58	19.67
3	1.50	57.41	747.76	782.91	13.75	119.75	1646.21	10.15	13.64
4	2.00	86.84	1067.00	1145.41	14.03	92.88	1302.80	11.09	13.19
5	1.50	55.77	711.99	749.43	13.88	125.09	1735.86	10.38	13.44
6	2.00	70.31	911.18	965.46	14.01	110.19	1543.33	10.66	13.73
Арифм. средн.	1.67	67.91	942.85	1005.01	14.39	103.39	1480.50	11.09	14.75
Ошибка средн.	0.11	4.69	97.54	103.36	0.32	7.68	95.50	0.38	1.01
Станд. откл.	0.26	11.48	238.91	253.19	0.79	18.81	233.93	0.93	2.47
Козф. вариаци (%)	15.49	16.90	25.34	25.19	5.51	18.19	15.80	8.39	16.77
Медиана	1.50	67.32	886.87	960.28	14.02	104.17	1546.35	10.87	13.68
Геом. ср	1.65	67.13	919.83	980.27	14.37	101.88	1463.87	11.06	14.60

Полученные данные позволяют констатировать, что наибольшая концентрация кобальта в плазме крови отмечается через 1,7 часа после введения антидота и составляет 67,91±4,69 мкл/мг; последующее снижение его концентрации характеризуется временем

половинного убывания $11,09 \pm 0,38$ часов. Общее время присутствия кобальта в организме составляет $14,39 \pm 0,32$ часов. Объем распределения составляет порядка 14 л/кг.

Выводы

1. Пероральная лекарственная форма образца потенциального перорального антидота цианидов по параметрам острой токсичности относится к классу малотоксичных лекарственных веществ.
2. Внутривентрикулярное введение кроликам модельного образца потенциального перорального антидота цианидов в дозах 40 и 200 мг/кг в условиях подострого эксперимента не влияет на внешний вид, общее состояние и поведение животных, не оказывает негативного влияния на биохимические параметры крови и основные физиологические функции организма, не вызывает патоморфологических изменений, что свидетельствует о хорошей переносимости и малой токсичности препарата. Изменения, происходящие при введении максимальной дозы антидота – 500 мг/кг, кратковременны и не регистрируются после восстановительного периода.
3. Модельный образец потенциального антидота цианидов обладает слабо выраженным кумулятивным эффектом (коэффициент кумуляции – 1,2).
4. При внутривентрикулярном введении кроликам модельного образца потенциального антидота цианидов в дозе 100 мг/кг наибольшая концентрация кобальта в плазме крови фиксируется через 1.7 часа после введения препарата и составляет $67,91 \pm 4,69$ мкг/мл; последующее снижение концентрации кобальта характеризуется временем половинного убывания, равного $11,09 \pm 0,38$ часов; общее среднее время присутствия кобальта в организме составляет $14,39 \pm 0,32$ часов; объем распределения – 14 литров/кг.
5. Исследованная пероральная лекарственная форма потенциального антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислоты не имеет противопоказаний для клинических испытаний и медицинского применения.

Список литературы

1. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – С. 32–36.
2. Прозоровский В.Б., Прозоровская М., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакол. и токсикол. – 1978. – № 4. – С. 497–502.
3. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2011. – 832 с.

4. Лойт А.О., Савченко М.Ф. Профилактическая токсикология. Руководство для токсикологов-экспериментаторов. Изд. Иркутского ун-та. – 1996. – С. 82–87.
5. Hodge H.et al. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore. – 1975. – P. 42.

Рецензенты:

Сарманаев С.Х., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой «Токсикология и клиническая фармакология», ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России, г. Москва.

Образцов Н.В., д.м.н., с.н.с., профессор кафедры «Токсикология и клиническая фармакология», ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России, г. Москва.