

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2006

С. Ю. Гармонов¹, В. И. Погорельцев², Н. С. Шитова¹, Т. А. Киселева²,
Е. В. Дегтерев³, М. И. Евгеньев¹

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА КСИМЕДОНА НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

¹ Казанский государственный технологический университет;

² Казанский государственный медицинский университет;

³ Центр химии лекарственных средств — ВНИХФИ, Москва

Изучена фармакокинетика гидразида изоникотиновой кислоты при совместном приеме с иммуномодулятором ксимедоном. Выявлено индукционное влияние ксимедона на генетически детерминированные фармакокинетические параметры гидразида изоникотиновой кислоты. Установлены дозо-зависимые и временные схемы введения ксимедона человеку с целью получения эффекта индукции процессов ацетилирования.

В настоящее время гидразид изоникотиновой кислоты (изониазид, ГИНК) находит широкое применение в качестве одного из основных компонентов во всех схемах противотуберкулезной химиотерапии [1, 2]. Изониазид в организме подвергается генетически детерминированным метаболическим превращениям путем N-ацетилирования под контролем фермента N-ацетилтрансферазы (NAT) гепатоцитов с участием кофермента А [3 – 6]. В зависимости от фенотипа ацетилирования метаболизм ксенобиотиков, инактивирующихся с участием NAT, имеет быстрый или медленный характер. При этом показано влияние различных патологических факторов на активность NAT, фенотипирование которой в ряде случаев может использоваться в качестве прогностического критерия риска возникновения периферической нейропатии, неврологических нарушений, лекарственных гепатитов при терапии изониазидом и служит основой для подбора оптимальных доз этого лекарственного вещества (ЛВ) [7].

Под действием некоторых лекарственных препаратов может происходить ускорение или замедление метаболизма изониазида в результате индукции или ингибирования NAT. Скорость биотрансформации при этом может изменяться в 2 – 4 раза [8 – 11]. По этой причине для снятия некоторых побочных эффектов и предотвращения осложнений больным туберкулезом рекомендуется назначать пиридоксин, который ускоряет процесс биотрансформации изониазида. В результате приема пиридоксина происходит индукция фермента N-ацетилтрансферазы, в результате чего изменяется величина периода полувыведения самого индуктора, либо вещества, принимаемого одновременно с индуктором, если данный препарат метаболизируется индуцируемым ферментом [8].

Обнаружено, что тем же эффектом обладает и отечественный иммуномодулятор ксимедон — лекарственный препарат пиримидинового ряда, включение которого в комплексное лечение распространенных

форм туберкулеза вызывало более выраженное терапевтическое действие, чем чистая базисная химиотерапия [12, 13]. Одним из механизмов такой терапевтической эффективности ксимедона является выраженное иммуностимулирующее действие [12]. При этом важен подбор индивидуальных оптимальных доз индуктора для каждого пациента, поскольку от нее зависит эффективность и безопасность лечения, а также время наступления первичного терапевтического эффекта [7, 8, 14].

В связи с этим целью настоящей работы является изучение особенностей фармакокинетики гидразида изоникотиновой кислоты при совместном приеме ксимедона, а также установление временных и дозо-зависимых эффектов индукции N-ацетилтрансферазы ксимедоном в организме человека.

Экспериментальная часть

Спектрофотометрические измерения были проведены на спектрофотометре СФ-26. При разработке методики была использована хроматографическая система HP-1100 с диодно-матричным детектором (“Hewlett-Packard”, “Waldbronn”, Германия). Потенциометрические измерения выполнены на электронном pH-милливольтметре MV-87S (Германия). Лекарственная форма изониазида и ксимедона — таблетки по 0,3 и 0,25 г фармакопейной чистоты, соответственно. Растворители квалификации ч.д.а. использовали без дополнительной очистки.

Фармакокинетические параметры экскреции изониазида мочой определялись до и после приема лекарственного препарата ксимедона в различных дозах от 125 до 2000 мг. Исследования проводились в группе 35 здоровых добровольцев под контролем этического комитета Республики Татарстан. Возраст обследуемых колебался от 18 до 25 лет.

Таблица 1

Индукция N-ацетилтрансферазы в зависимости от дозы и частоты приема ксимедона

Фенотип ацетилирования	Индукция N-ацетилтрансферазы в зависимости от дозы и частоты приема ксимедона, %							
	0,5 г				0,25 г			
	4 раза в день	4 раза в день, 3 дня	4 раза в день, исследование через сутки	4 раза в день	2 раза в день	0,125 г 2 раза в день	0,0625 г 2 раза в день	
Быстрый	33 ± 8	39 ± 12	13 ± 5	12 ± 3	32 ± 9	30 ± 10	23 ± 8	
Медленный	13 ± 2	15 ± 6	48 ± 15	25 ± 4	53 ± 10	51 ± 16	83 ± 9	

Фенотип ацетилирования оценивали при использовании в качестве аналитического реагента для определения изониазида в моче метаванадата аммония [15].

Для расчета фармакокинетических параметров по экспериментальным данным использована программа M-IND, в которой применен модельно-независимый анализ фармакокинетики [16]. Она позволяет проводить первичную обработку данных “концентрация — время” в крови и моче для различных способов введения и рассчитывать системные параметры лекарственных средств методом статических моментов. В основе модельно-независимого метода статических моментов лежит оценка площади под концентрационной кривой ЛВ (AUC), константы элиминации (K_{el}), времени полувыведения ($T_{1/2}$) и объема распределения (V_d).

Индукцию N-ацетилтрансферазы ксимедоном выражали количественно (в %) по отношению фракции дозы ГИНК, экскретируемого с мочой в течение 6 ч после приема лекарственного препарата, до и после приема индуктора ксимедона.

Методика определения активности N-ацетилтрансферазы. Изониазид однократно перорально вводится пациенту в дозе 0,45 г. До приема препарата па-

циент освобождает мочевого пузырь и мочу используют, как контрольную пробу. Далее мочу собирают каждые 2 ч в течение 6 ч после приема тест-маркера. В почасовых пробах мочи определяют содержание ГИНК спектрофотометрическим методом. Для определения концентрации ГИНК отбирают 0,3 мл мочи, добавляют 7,7 мл дистиллированной воды и 2 мл 2,2 % раствора метаванадата аммония в 10 % серной кислоте. Измеряют оптическую плотность при аналитической длине волны 430 нм. По полученным данным строят кинетические кривые, рассчитывают фракцию дозы ГИНК и оценивают фенотип ацетилирования пациента. Количество экскретируемого ГИНК определяют по градуировочному графику, на котором хорошо воспроизводимые зависимости оптической плотности от концентрации линейны в области концентраций $5 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что при больших дозах ксимедона по 0,5 г четыре раза в день (однодневный и трехдневный прием) более значительная индукция характерна для быстрых ацетиляторов; при меньших дозах от 0,25 г четыре раза в день до 0,0625 г два раза в день большая индукция присуща медленным ацетиляторам (табл. 1). Этим феноменом определяется высокая индукция у пациентов, принимавших ксимедон в наибольшей дозе, при этом регистрация индукции осуществлялась через сутки после приема индуктора. Очевидно, к этому времени концентрация ксимедона в крови резко снижалась. По полученным результатам рассчитаны фармакокинетические параметры ГИНК при индукции ацетилирования и найден максимальный интервал сохранения индукции ксимедоном (табл. 2, 3).

При приеме ксимедона за сутки до определения фенотипа ацетилирования большая индукция наблюдалась у медленных ацетиляторов, несмотря на прием большей дозы индуктора. Это может объясняться тем, что у быстрых ацетиляторов максимальные значения индукции были в первые сутки после принятия акти-

Таблица 2

Фармакокинетические параметры изониазида при индукции процесса ацетилирования ксимедоном

Доза ксимедона	Фенотип ацетилирования	AUC , мкг · ч/мл	K_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	V_d , мл
Без приема ксимедона	быстрый	21630 ± 2300	0,5546 ± 0,058	1,35 ± 0,18	41,7 ± 4,5
	медленный	77590 ± 14220	0,2298 ± 0,074	3,97 ± 0,25	32,2 ± 3,4
0,5 г 4 раза в день	быстрый	21960 ± 4470	0,338 ± 0,135	2,50 ± 0,98	78,8 ± 36,9
	медленный	122220 ± 16940	0,3078 ± 0,0803	5,04 ± 1,20	29,2 ± 9,0
0,5 г 4 раза в день, 3 дня	быстрый	18090 ± 3250	0,5698 ± 0,0702	2,52 ± 0,25	404 ± 42
	медленный	62290 ± 9670	0,2559 ± 0,0190	4,09 ± 0,95	53,8 ± 11,2
0,5 г 4 раза в день, исследование через сутки	быстрый	11770 ± 2130	0,2217 ± 0,0150	2,22 ± 0,47	102 ± 26
	медленный	32480 ± 2450	0,343 ± 0,058	16,1 ± 2,3	214 ± 28
0,25 г 2 раза в день	быстрый	18100 ± 1360	0,5021 ± 0,0260	1,52 ± 0,68	117 ± 32
	медленный	44670 ± 5360	0,1594 ± 0,0304	4,35 ± 1,23	63,3 ± 20,3
0,125 г 2 раза в день	быстрый	29960 ± 2150	0,150 ± 0,058	1,64 ± 0,94	149 ± 36
	медленный	59720 ± 6230	0,288 ± 0,025	3,87 ± 1,07	38,4 ± 9,6
0,0625 г 2 раза в день	быстрый	32410 ± 1150	0,3297 ± 0,0501	3,12 ± 1,46	93,5 ± 15,3
	медленный	36600 ± 1250	0,6461 ± 0,024	1,07 ± 1,32	19,0 ± 8,2

ватора, на вторые сутки индукция пошла на убыль, в то время как у медленных ацетиляторов значения индукции остаются высокими из-за медленного метаболизма.

Ксимедон является иммуномодулятором, проявляющим иммуностимулирующий или иммунодепрессантный эффект в зависимости от дозы препарата [12]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что в отношении эффекта индукции возможны два механизма действия: субстратзависимый и субстратнезависимый (триггерный). Так например, у быстрых ацетиляторов значения индукции при дозировании препарата по 1 и 2 г в сутки практически одинаковы. Это связано с тем, что регистрация индукции при суточной дозе 2 г осуществлялась через сутки после приема препарата. По всей видимости, суточная доза ксимедона, равная 1 г, является “пороговой” для проявления ксимедоном субстратзависимого механизма действия (чем больше доза, тем выше эффект). Однако при дальнейшем уменьшении дозы наблюдается увеличение показателей индукционного процесса, которое невозможно объяснить с позиций субстратзависимого механизма, что позволяет предположить пусковой (субстратнезависимый) механизм действия. Ведь известно, что высокие концентрации субстрата начинают тормозить вызываемую этим же субстратом биохимическую реакцию [14, 17]. Подобные изменения интервала доз были зафиксированы нами и в случае медленных ацетиляторов с той лишь разницей, что “порог” пусковой дозы сдвинут в сторону уменьшения ее значений. Это связано с тем, что в случае медленной активности NAT дольше сохраняется высокая концентрация препарата.

В табл. 2 представлены фармакокинетические параметры для быстрых и медленных ацетиляторов, которые были рассчитаны по концентрации ГИНК, экскретируемого с мочой как при приеме индуктора в различных дозах, так и без него.

Представленные нами данные свидетельствуют о том, что для медленных ацетиляторов объем распределения во всех случаях будет меньше (как при приеме

Таблица 3
Динамика индукции в зависимости от времени приема разовой дозы ксимедона 1 г и типа ацетилирования

Тип ацетилирования	Индукция N-ацетилтрансферазы в зависимости от интервала времени от принятия индуктора до начала регистрации индукции, %				
	20 ч	16 ч	12 ч	8 ч	4 ч
Быстрый	Нет индукции	15 ± 3	19 ± 1	20 ± 2	33 ± 5
Медленный	Нет индукции	23 ± 2	30 ± 5	34 ± 7	49 ± 6

индуктора, так и без него), чем для быстрых инактиваторов ГИНК. Следовательно, концентрация препарата в крови сразу после его введения для быстрых ацетиляторов выше, чем для медленных. Из этого можно сделать вывод, что фармакологический эффект у быстрых ацетиляторов выше и может наблюдаться и при меньшей дозе ЛВ.

В линейной фармакокинетике величина *AUC* пропорциональна количеству ЛВ, достигшего системного кровотока. Как видно из полученных данных (табл. 4), величина площади под фармакокинетической кривой возрастает с увеличением выведения ГИНК в неизменном виде. Для медленных ацетиляторов характерны большие значения *AUC*.

Для быстрых ацетиляторов характерен более короткий период полувыведения $T_{1/2}$ и, следовательно, более высокие константы элиминации. Для быстрых ацетиляторов время полувыведения препаратов составило $1,35 \pm 0,18$ ч, тогда как для медленных ацетиляторов данное время в три раза больше $3,97 \pm 0,25$ ч. Практически та же разница (в 2,5 раза) наблюдается и для константы элиминации K_{el} $0,5546 \pm 0,058$ ч⁻¹ — для быстрых ацетиляторов и $0,2298 \pm 0,1$ ч⁻¹ — для медленных, что подтверждает достоверное отличие фармакокинетических параметров для разных типов ацетилирования.

Для параметров, полученных при нахождении максимального интервала сохранения индукции ксимедоном, также были рассчитаны фармакокинетические

Таблица 4
Фармакокинетические параметры изониазида при приеме 1 г ксимедона *per os* за промежуток времени от 20 до 4 ч до введения тест-маркера

Промежуток времени от принятия индуктора до начала анализа	Фенотип ацетилирования	<i>AUC</i> , мкг · ч/мл	K_{el} , ч ⁻¹	$T_{1/2}$, ч	V_d , мл
Без ксимедона	Быстрый	19380 ± 3060	0,6649 ± 0,2505	0,96 ± 0,81	28,4 ± 19,9
	Медленный	61190 ± 9740	0,4248 ± 0,0853	1,71 ± 0,35	19,4 ± 6,7
20 ч	Быстрый	24700 ± 470	0,2395 ± 0,0490	1,32 ± 0,47	80,3 ± 16,9
	Медленный	83950 ± 9420	0,3916 ± 0,250	3,33 ± 2,12	24,1 ± 12,7
16 ч	Быстрый	17450 ± 700	0,5473 ± 0,100	1,32 ± 0,05	50,1 ± 12,8
	Медленный	67890 ± 5710	0,241 ± 0,074	3,78 ± 1,73	38,1 ± 19,5
12 ч	Быстрый	17200 ± 1970	0,4132 ± 0,0055	1,68 ± 0,01	64,2 ± 6,4
	Медленный	119830 ± 20100	0,0967 ± 0,0015	7,17 ± 0,07	47,5 ± 3,8
8 ч	Быстрый	18460 ± 4450	0,2891 ± 0,0133	2,40 ± 0,07	91,6 ± 24,4
	Медленный	45930 ± 7670	0,2531 ± 0,2105	17,69 ± 1,50	38,0 ± 18,4
4 ч	Быстрый	11450 ± 350	0,4759 ± 0,0041	1,46 ± 0,01	82,7 ± 3,2
	Медленный	26030 ± 6620	0,2619 ± 0,005	2,65 ± 0,07	5,1 ± 2,7

Таблица 5

Индукция N-ацетилтрансферазы в зависимости от дозы индукторов ацетилирования

Фенотип ацетилирования	Индукция N-ацетилтрансферазы в зависимости от дозы активатора, %				
	Пантотенат кальция		Пиридоксина гидрохлорид		
	Доза 0,75 г	Доза 0,5 г	Доза 0,04 г	Доза 0,02 г	Доза 0,01 г
Быстрый	44 ± 9	21 ± 6	20 ± 6	13 ± 3	Нет индукции
Медленный	16 ± 2	Нет индукции	43 ± 6	37 ± 3	34 ± 2

параметры (табл. 4). Учитывая, что период полувыведения препарата у здоровых людей составляет 5,5 ч, то становилось понятным, почему через 20 ч после однократного приема препарата не возникает индукции — его фактически (через четыре периода $T_{1/2}$) не остается в системном русле [12]. Данный факт положительно характеризует вещество как практически нетоксичное соединение. Представляют интерес данные о том, что при пероральном введении ксимедона однократно в дозе 1 г через 20 ч индукция не наблюдалась, тогда как при введении в два раза меньшей дозы 0,5 г индукция сохранялась и через 20 ч (табл. 3). Данный факт можно объяснить особенностью воздействия ксимедона на ферментативный комплекс ацетилирования. Очевидно, препарат запускает триггерный механизм активации, не являясь при этом субстратом реакции. Возможно, если ксимедон будет субстратом реакции, физиологический эффект ее будет несколько иной.

Кроме того, в рамках данной работы была установлена возможность возникновения индукции при приеме иммуномодулятора ксимедона одновременно с тест-маркером ГИНК и через 30 мин после введения последнего. Данное наблюдение подтверждает предположение о триггерном характере воздействия ксимедона на ферментный комплекс и дает возможность использовать это свойство не только для профилактики различных интоксикаций (в том числе и эндогенного происхождения), но и для лечения отравлений, когда с момента принятия яда прошло значительное время.

Для сравнения активаторов N-ацетилирования проверялось влияние на фармакокинетику ГИНК известных индукторов пантотената кальция и пиридоксина гидрохлорида [3, 17]. Как видно из табл. 5, индуцирующий эффект этих активаторов сопоставим с индукцией ксимедоном на процессы ацетилирования. Сле-

дует отметить, что при приеме пантотената кальция и пиридоксина гидрохлорида величина индукции пропорциональна дозе индуктора.

Таким образом, изучено влияние ксимедона на генетически детерминированные фармакокинетические параметры гидразиды изоникотиновой кислоты и установлены дозо-зависимые и временные схемы введения ксимедона человеку с целью получения эффекта индукции процессов ацетилирования.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-03-96241).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, т. 2, Новая Волна, Москва (2000).
2. *Лечение туберкулеза: руководящие принципы для национальных программ*, ВОЗ, Женева (1994).
3. D. W. Nebert and W. W. Weber, *Pharmacogenetics. Principles of drug action. The basis of pharmacology*, 3rd edition, Churchill Livingstone Inc., New York (1990).
4. D. W. Nebert, R. A. McKinnon, A. Puga, *DNA Cell Biol.*, **15**, 273 – 280 (1996).
5. F. J. Gonzalez and J. R. Idle, *Clin. Pharmacokinet.*, **26**, 59 – 70 (1994).
6. D. M. Grant, N. C. Hughes, S. A. Janezic, et al., *Mutation Res.*, **376**, 61 – 70 (1997).
7. С. Ю. Гармонов, М. И. Евгеньев, И. Е. Зыкова, *Вопросы биол. мед. и фармац. химии*, **1**, 3 – 20 (2004).
8. Л. Е. Холодов, В. П. Яковлев, *Клиническая фармакокинетика*, Медицина, Москва (1985).
9. Ю. Н. Чернов, И. Роотс, Е. А. Гайкович, *В мире лекарств*, **1**, 24 – 25 (2001).
10. И. И. Мирошниченко, *Основы фармакокинетики*, ГЭОТАР-МЕД, Москва (2002).
11. И. И. Каркищенко, В. В. Хоронько, С. А. Сергеева, В. И. Каркищенко, *Фармакокинетика*, Феникс, Ростов-на-Дону (2001).
12. Г. А. Измайлов, М. Ю. Аверьянов, В. С. Резник, *Ксимедон в клинической практике*, НМГА, Н. Новгород (2001).
13. Ю. Д. Слабнов, О. В. Фирсов, А. А. Визель, А. П. Цибулькин, *Казанский мед. журн.*, **4**, 259 – 263 (1996).
14. С. Н. Голиков, И. В. Саноцкий, Л. А. Тиунов, *Общие механизмы токсического действия*, Медицина, Москва (1986).
15. П. Джорджеску, Е. Пэунеску, *Биохимические методы диагноза и исследования*, Медицинское издательство, Бухарест (1963).
16. В. И. Погорельцев, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (1991).
17. Ю. Б. Белоусов, В. С. Моисеев, В. К. Лепяхин, *Клиническая фармакология и фармакотерапия: Руководство для врачей*, Универсум, Москва (1993).

Поступила 05.04.05

INFLUENCE OF THE IMMUNOMODULATOR XIMEDONE ON THE PHARMACOKINETICS OF ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE IN THE HUMAN ORGANISMS. Yu. Garmonov¹, V. I. Pogorel'tsev², N. S. Shitov¹, T. A. Kiseleva², E. V. Degterev³, and M. I. Evgen'ev²¹ Kazan State Technological University, Kazan, Tatarstan, Russia;² Kazan State Medical University Kazan, Tatarstan, Russia;³ Center for Drug Chemistry – All-Russia Research Institute of Pharmaceutical Chemistry, Moscow, Russia

The pharmacokinetics of isonicotinic acid hydrazide upon joint administration with the immunomodulator ximедone has been investigated. Ximедone influences the genetically determined parameters of the isonicotinic acid hydrazide pharmacokinetics. The dose-dependent and temporal schedules of ximедone introduction in humans are established, which favor the induction of acetylation processes in the patients.