

Э. Р. Переверзева¹, М. И. Трещалин¹, Е. Н. Бычкова¹,
А. Н. Тевяшова^{1, 2*}, И. Д. Трещалин¹

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ АМФАМИДА — НОВОГО ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО АМФОТЕРИЦИНА В

¹ ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф. Гаузе", Россия, 119021, Москва.

² Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Россия, 125047, Москва.

* e-mail: chulis@mail.ru

Несмотря на значительную токсичность и проблемы с растворимостью, амфотерицин В (AmB) остается препаратом первого выбора при лечении большинства тяжелых грибковых инфекций. В результате скрининга серии новых полусинтетических производных полиеновых макролидов отобран N-(2-аминоэтил)амид амфотерицина В (амфамид), обладающий рядом конкурентных преимуществ перед исходным полиеном. На основе амфамида разработан прототип лекарственной формы для парентерального применения, обеспечивающей высокую растворимость и стабильность действующего вещества при хранении. Изучена хроническая токсичность готовой лекарственной формы амфамида в хроническом эксперименте на кроликах. Выявленные токсические эффекты лекарственной формы амфамида были обратимы и зависели от величины примененной дозы.

Ключевые слова: амфамид; амфотерицин В; лекарственная форма; хроническая токсичность; кролики.

Системные грибковые инфекции представляют серьезную опасность для пациентов с ослабленным иммунитетом. Арсенал же доступных противогрибковых препаратов для лечения таких инфекций весьма ограничен [1]. Наиболее эффективным лекарственным средством, обладающим высокой активностью в отношении многих грибковых патогенов, до настоящего времени остается полиен амфотерицин В (AmB). Несмотря на многолетние усилия исследователей разных стран, направленные на преодоление основных недостатков AmB — выраженной токсичности и низкой растворимости, создание аналогов и новых лекарственных форм препарата остается актуальным [2].

В результате скрининга серии новых полусинтетических производных AmB отобран его N-(2-аминоэтил)амид, проявивший наиболее высокую противогрибковую активность, и на его основе создан прототип лекарственной формы для парентерального применения, обеспечивающей высокую растворимость в физиологически приемлемых водных средах и стабильность действующего вещества при хранении [3 – 8]. Целью исследования была оценка токсических свойств разработанной его лекарственной формы [9].

Экспериментальная химическая часть

В работе использован препарат амфамид в лекарственной форме, представляющей собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения [9]. Действующее вещество: L-глутамат N-(2-аминоэтил)амида амфотерицина В (2 мг в расчете на основание амфамида), вспомогательные вещества: 2-(гидроксипропил)-β-циклодекстрин (10 мг), производитель ФГБНУ "НИИНА", Россия.

Экспериментальная биологическая часть

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [10]. Исследование проведено на 36 половозрелых кроликах породы Советская шиншилла самцах и самках массой 2500 – 2800 г, полученных из Электрогорского филиала Научного центра биомедицинских технологий РАН "Белый Мох". Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ "НИИНА" на стандартном рационе экструзированных гранулированных кормов и со свободным доступом к питьевой воде. После двухнедельного карантина животные были введены в эксперимент.

Оценка хронической токсичности амфамида на кроликах при внутривенном введении амфамида осуществлялась в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11]. Животные были разделены на 6 групп (3 группы самцов и 3 группы самок) по 6 особей в каждой. Для исследования в качестве суммарных доз были выбраны дозы 1,5 мг/кг (однократная максимально переносимая доза — МПД) и 2,25 мг/кг (однократная ЛД₅₀). Значения МПД и ЛД₅₀ для кроликов были получены пересчетом с соответствующих доз для крыс, определенных при изучении острой токсичности амфамида, с использованием km фактора [12]. Разовые суточные дозы составили соответственно 0,05 и 0,09 мг/кг. Амфамид растворяли в 5 % растворе глюкозы и вводили в краевую вену уха кроликов ежедневно в течение 30 дней с интервалом 24 ч. Контрольные животные получали внутривенно 5 % рас-

Содержание креатинина и мочевины (мкмоль/л) в сыворотке крови кроликов после курса введения амфамида ($M \pm m$)

Группа	Самцы		Самки	
	креатинин	мочевина	креатинин	мочевина
1 сут после курса				
Σ МПД	*81,13 ± 9,47	*9,60 ± 0,32	*89,90 ± 9,53	*10,50 ± 0,80
ΣЛД ₅₀	*91,70 ± 5,02	*11,13 ± 0,61	*100,80 ± 2,35	*12,37 ± 0,84
Контроль	60,00 ± 2,59	7,73 ± 0,76	61,17 ± 7,84	8,27 ± 1,01
30 сут после курса				
Σ МПД	67,97 ± 10,06	7,27 ± 0,15	66,03 ± 7,91	8,27 ± 0,32
ΣЛД ₅₀	*77,70 ± 6,29	7,13 ± 0,45	*72,50 ± 6,24	8,17 ± 0,55
Контроль	59,10 ± 3,03	7,00 ± 0,61	59,17 ± 5,74	8,47 ± 0,51

* Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

твор глюкозы в объёме, эквивалентном объёму раствора, вводимому подопытным животным, получавшим амфамид. Наблюдение продолжали в течение 30 сут после прекращения введений.

В ходе эксперимента проводили визуальный, инструментальный и лабораторный контроль состояния животных. Массу тела кроликов определяли 1 раз в неделю при помощи весов “Сартогосм” (Россия). Клинический анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоцитарная формула и гематокрит) производили на 1, 7, 15 и 30 дни во время курса и на 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 30 сут по окончании курса введений (автоматический гематологический анализатор “Abacus Junior Vet” (Diatron, Австрия). На 1 и 30 день после окончания курса введения препарата в сыворотке крови определяли аланиновую (АЛТ) и аспарагиновую (АСТ) аминотрансферазу, щелочную фосфатазу (ЩФ), креатинин, мочевины, билирубин (прямой и общий), общий белок, альбумин, глюкозу

(автоматический биохимический анализатор ChemWell, Awareness Technology Inc., США). На 1 и 30 день по окончании курса введения регистрировали ЭКГ во втором стандартном отведении (электрокардиограф ЭКГТ-07, “Аксион”, Россия), производили клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес) с помощью автоматического анализатора мочи Laura Smart (Erba Лахема, Чехия).

На 1 и 30 сут после окончания курса введения препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Определяли массовые коэффициенты сердца, печени, почек, тимуса и селезенки. Участки внутренних органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия

Клинический анализ мочи кроликов после курса введения амфамида

Группа	Эритроциты, мкл	Лейкоциты, мкл	Уробилиноген, мкмоль/л	Кетоны, ммоль/л	Нитраты	Белок, %	Удельный вес
Самцы							
1 сут после курса							
Σ МПД	*0 – 25	*0 – 25	*10 – 17	*0 – 0,5	–	*> 3,0	1,020 – 0,011
ΣЛД ₅₀	*10 – 50	*0 – 25	*10 – 17	*0 – 0,5	*+	*> 5,0	*1,035 – 0,003
Контроль	–	–	–	–	–	–	1,015 ± 0,004
30 сут после курса							
Σ МПД	–	–	–	–	–	≤ 0,3	1,019 ± 0,010
ΣЛД ₅₀	–	–	*10 – 17	*0 – 0,5	–	≤ 0,3	1,020 ± 0,010
Контроль	–	–	–	–	–	≤ 0,3	1,018 ± 0,010
Самки							
1 сут после курса							
Σ МПД	*0 – 25	*10 – 25	*10 – 17	*0 – 0,5	–	*2,0 – 2,6	1,020 ± 0,007
ΣЛД ₅₀	*10 – 25	*25 – 50	*10 – 17	*0 – 0,5	*+	*3,2 – 7,8	*1,032 ± 0,002
Контроль	–	–	–	–	–	–	1,021 ± 0,011
30 сут после курса							
Σ МПД	–	–	–	–	–	≤ 0,3	1,015 ± 0,008
ΣЛД ₅₀	–	–	*10 – 17	*0 – 0,5	–	≤ 0,3	1,022 ± 0,009
Контроль	–	–	–	–	–	≤ 0,3	1,018 ± 0,010

t-Фишера — Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Животные подопытных групп хорошо переносили введение амфамида, прибавляли в массу тела, отклонений в состоянии и поведении на протяжении эксперимента не отмечено. Общее количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитарная формула, содержание гемоглобина, величина гематокрита не отличались от контроля.

При клинико-лабораторном исследовании были выявлены признаки нефротоксичности амфамида. Так, применение амфамида в обеих изученных дозах приводило на 1 сут после курса к повышению содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови самцов и самок. У кроликов, получивших суммарно МПД, эти показатели к концу наблюдения возвращались к уровню контроля. У животных, получавших амфамид в высокой дозе, повышенный уровень креатинина сохранялся в течение 1 мес по окончании введения (табл. 1).

На 1 сут по окончании курса введения амфамида в обеих изученных дозах в моче самцов и самок были найдены эритроциты, лейкоциты, уробилиноген, кетоны, белок (табл. 2). У животных, получавших амфамид в высокой дозе, был увеличен удельный вес мочи и к тому же обнаружены нитраты. На 30 сут после отмены препарата в группах кроликов, получавших амфамид в высокой дозе, сохранялось повышенное содержание уробилиногена и кетонов. Остальные показатели не отличались от контроля.

На 1 сут после курса введения препарата во всех подопытных группах выявлено увеличение массовых коэффициентов почек (табл. 3). На 30 сут отличий от контроля не обнаружено.

Изучение патологических изменений внутренних органов кроликов, возникающих под действием амфамида, подтвердило, что нефротоксичность — основной вид токсичности этого антибиотика. Применение амфамида приводило к развитию экстракапиллярного гломерулонефрита, который проявлялся в виде гиперплазии париетального эндотелия клубочков с образованием полулуний, а также дистрофических и атрофических изменений в канальцах. Процесс носил фокальный характер и завершался склерозом части клубочков и формированием кист на месте поврежденных канальцев. Масштаб патологических изменений и ско-

рость репарации зависели от величины примененной дозы амфамида.

Использование амфамида в дозе, суммарно составляющей МПД, вызывало также изменения тканей легких, желудка и семенников. Структура слизистой оболочки желудка и сперматогенного эпителия к концу наблюдения полностью восстанавливалась. Гемодинамические нарушения в сосудах легкого сохранялись до конца наблюдения. Морфологические изменения слизистой оболочки желудка были ассоциированы, главным образом, с главными клетками. При курсовом введении амфамида в низкой дозе они выражались в транзиторной активации их функции. Использование амфамида в высокой дозе приводило к уменьшению числа главных клеток и некрозу отдельных желез. В течение 1 мес структура слизистой оболочки желудка восстанавливалась, очаги некроза подвергались организации.

Введение амфамида в дозе, суммарно равной ЛД₅₀, помимо упомянутых выше органов, оказывало повреждающее действие на структуру сердца и печени. Влияние амфамида на миокард проявлялось отсрочено, и у части животных сопровождалось фиброзом эндокарда. Гепатотоксические свойства амфамида морфологически регистрировались в виде единичных мелких очагов микронекроза, которые к концу наблюдения подвергались склерозу.

Проведенное исследование позволило выявить ряд преимуществ амфамида по сравнению с исходным АмВ. В экспериментальных и клинических исследованиях, посвященных изучению токсических свойств АмВ, было установлено, что при его применении происходит уменьшение числа циркулирующих эритроцитов в периферической крови, снижение величины гематокрита, уровня гемоглобина, развивается лейкопения и тромбоцитопения [13, 14]. В терапевтических дозах амфамид вызывает снижение массы тела, диарею, повышение активности печеночных ферментов, перипортальный и центрлобулярный некроз гепатоцитов, кардиомиопатию [13–15]. В отличие от АмВ, амфамид гематотоксическими свойствами не обладает. Признаки гастроинтестинальной, гепато- и кардиотоксичности проявляются только морфологически в случае использования амфамида в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀.

Таким образом, изменения структуры внутренних органов кроликов, возникающие под действием амфамида, зависят от величины примененной дозы и в большинстве случаев обратимы в течение 30 сут. Это позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения. При длительном ежедневном применении амфамида следует учитывать возможность развития острой почечной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Scorzoni, A. C. A. de Paula Silva, C. M. Marcos, et al., *Front. Microbiol.*, **8**, 36 (2017); doi: 10.3389/fmicb.2017.00036.

Таблица 3
Массовые коэффициенты почек кроликов

Группа	1 сут после курса		30 сут после курса	
	самцы	самки	самцы	самки
Σ МПД	*0,39 ± 0,02	*0,41 ± 0,04	0,37 ± 0,06	0,31 ± 0,05
ΣЛД ₅₀	*0,45 ± 0,06	*0,46 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,33 ± 0,06
Контроль	0,32 ± 0,04	0,29 ± 0,06	0,24 ± 0,08	0,29 ± 0,07

* Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

2. O. A. Omelchuk, A. N. Tevyashova, A. E. Shchekotikhin, *Rus. Chem. Rev.*, **87**(12), 1206 – 1225 (2018); doi: 10.1070 / RCR4841.
3. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, et al., *J. Med. Chem.*, **52**(1), 189 – 196 (2009); doi: 10.1021 / jm800695k.
4. M. N. Preobrazhenskaya, E. N. Olsufyeva, A. N. Tevyashova, et al., *J. Antibiotics*, **63**(2), 55 – 64 (2010); doi: 10.1038 / ja.2009.118.
5. A. N. Tevyashova, E. N. Olsufyeva, S. E. Solovieva, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**(8), 3815 – 3822 (2013); doi: 10.1128 / AAC.00270 – 13.
6. A. N. Tevyashova, A. M. Korolev, A. S. Trenin, et al., *J. Antibiotics*, **69**(7), 549 – 560 (2016); doi: 10.1038 / ja.2016.34.
7. S. S. Efimova, A. N. Tevyashova, E. N. Olsufyeva, et al., *PLoS ONE*, **12**(11), e0188573 (2017); doi: 10.1371 / journal.pone.0188573.
8. Патент РФ № 2688658 (2019), *Бюл. изобрет.*, № 15 (2019).
9. А. Н. Тевяшова, Е. Н. Бычкова, С. Е. Соловьева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **53**(10), 50 – 54 (2019); doi: 10.30906 / 0023-1134-2019-53-10-50-54.
10. *European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*, Council of Europe, ETS No. 123 (1986).
11. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Т. 1, Гриф и К, Москва (2012), сс. 13 – 24.
12. E. J. Freireich, E. A. Gehan, D. P. Rall, et al., *Cancer Chemother. Repts.*, **50**(4), 219 – 244 (1966).
13. C. Viscoli, C. Girmenia, A. Marinus, et al., *Clin. Infect. Dis.*, **28**(5), 1071 – 1079 (1999); doi: 10.1086/514731.
14. T. Massa, D. P. Sinha, J. D. Frantz, et al., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**(4), 737 – 753 (1985). doi: 10.1093/toxsci/5.4.737.
15. P. J. Danaher, M. K. Cao, G. M. Anstead, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**(1), 115 – 117 (2004); doi:10.1093/jac/dkg472.

Поступила 10.07.19

EXPERIMENTAL EVALUATION OF CHRONIC TOXICITY OF AMPHAMIDE – A NEW SEMISYNTHETIC DERIVATIVE OF AMPHOTERICIN B

E. R. Pereverzeva¹, M. I. Treshchalin¹, E. N. Bychkova¹, A. N. Tevyashova^{1,2*}, and I. D. Treshchalin¹

¹ G. F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

² D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia

* e-mail: chulis@mail.ru

Amphotericin B (AmB) remains a drug of first choice for treatment of the most severe mycoses, despite its significant toxicity and solubility problems. A new semisynthetic derivative of polyene macrolide – amphetamine, demonstrating advantages over parent antibiotic AmB, was selected as a result of the search for new antifungal drugs with improved characteristics. Parenteral drug formulation of amphetamine possessing high aqueous solubility and stability, as well as high antifungal activity has been developed. In the present study, toxicity of the new drug formulation of amphetamine was evaluated in chronic experiment on rabbits. Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography, and urinalysis were studied on experimental animals. Three animals in each test group were sacrificed 1 and 30 days post treatment and their internal organs were subjected to histological evaluation. Amphetamine formulation displayed dose-dependent reversible toxicity.

Keywords: amphotericin B; amphetamine drug formulation; chronic toxicity; rabbits.