

А.И. Сливкин¹, А.С. Беленова¹, С.В. Корниенко², Н.А. Дьякова^{1*}, Ю.В. Добрин¹

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия;

² Воронежский областной клинический противотуберкулезный диспансер имени Н.С. Похвисневой, Воронеж, Россия

*Автор для корреспонденции: Ninochka_V89@mail.ru

Новые полимерные комплексы гидразида изоникотиновой кислоты противотуберкулезного и иммуностимулирующего действия

Туберкулез относится к одному из социально значимых заболеваний. В научной литературе обоснована целесообразность использования полимерных матриц для иммобилизации протуберкулезных препаратов, что способствует завершению фагоцитоза. Проведено сравнительное исследование противотуберкулезной активности аналогов конденсата гидразида изоникотиновой кислоты при лечении экспериментального туберкулеза у мышей. Установлена эффективность использования хлоргидроксихитозанового комплекса с 1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном с включенным Co²⁺ в сравнении с хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном при лечении экспериментального туберкулеза. Выявлена иммуностимулирующая активность полимерного металлокомплекса, сравнимая с комплексом хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном. Полученные в эксперименте результаты могут использоваться при разработке современных методов лечения туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, полимерный металлокомплекс, хитозан, изониазид, противотуберкулезная активность.

Введение

Туберкулез относится к одному из социально значимых заболеваний, широко распространённых в мире у человека и животных. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения на 2017 год, ежегодно в мире туберкулезом заболевают до 10 миллионов человек, и около 1,5 миллионов человек умирают от данного заболевания [1]. Туберкулез вызывается различными видами микобактерий из группы *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis* и другими близкородственными видами). Туберкулез обычно поражает лёгкие, реже затрагивая другие органы и системы. *Mycobacterium tuberculosis* передаётся воздушно-капельным путём при разговоре, кашле и чихании больного. Чаще всего после инфицирования микобактериями заболевание протекает в бессимптомной, скрытой форме, но примерно один из десяти случаев скрытой инфекции переходит в активную форму [2, 3].

В научной литературе обосновывается целесообразность использования полимерных матриц для иммобилизации протуберкулезных препаратов, что способствует завершению фагоцитоза. Проведенный анализ научных публикаций дает основание утверждать, что бактериальные и вирусные антигены, конъюгированные с заряженными полимерными матрицами, формируют в организме высокую специфическую протекторную иммунную защиту против соответствующих патогенных антител [4]. Все это открывает возможность использования клеточных механизмов естественной защиты организма для подавления туберкулезной инфекции. Сообщается, что для борьбы с туберкулезной инфекцией целесообразно использовать полимерные модифицированные антибактериальные средства, обладающие возможностью адресной внутриклеточной доставки лекарства, восстанавливать естественные защитные механизмы организма, в частности, активировать функционирование макрофагов, проявляющих лизосомотропность, корригирующих процессы эндоцитоза [5, 6]. В качестве полимерных матриц применялся подвергнутый химической модификации декстран со средней молекулярной массой 30–40 тысяч [7, 8].

Целью исследования явилось проведение сравнительного исследования противотуберкулезной активности аналогов конденсата гидразида изоникотиновой кислоты при лечении экспериментального туберкулеза у мышей.

Материалы и методы

В представленной работе для иммобилизации 1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном (ИНГГ) (конденсата гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК) с глюкозой) [9] использована полимерная

матрица — водорастворимый катионоактивный аналог хитозана N-хлоргидроксипропилхитозан (ХГХТЗ) с высокой степенью диссоциации йоногенных групп [10], со средней молекулярной массой 10–12 тысяч [7, 11, 12], комплексированная с ионами кобальта (ГХТЗ-Со). Металлокомплексы модифицированных полиионов синтезировали по известной методике [13–15]. Содержание металлов в полимерметаллокомплексах определяли комплексонометрически [16]. Кристаллогидраты $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ марки ч.д.а. использовали после двойной перекристаллизации.

Связывание лекарственного вещества с ХГХТЗ-Со проводили в водном растворе при перемешивании в течение 90 мин с продувкой азотом (25 оС); соотношение полимер: ИНГГ, как 1:1, объемный модуль—26. Целевой продукт — гидроксипропилхитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозон (ГХТЗ-Со-ИНГГ) осаждали этанолом. Непрореагированный ИНГГ и образовавшаяся ГИНК выделяли и определяли количественной экстракцией с контролем исчерпывающего его излучения УФ-спектроскопией по полосе поглощения 262 нм в экстракте. По длинам электронных спектров центральный ион имеет октаэдрическое окружение. Геометрия связывания Co^{2+} в комплексе квадратно-планарная [5, 12, 17]. Содержание ИНГГ а в полученном продукте определяли элементным анализом на азот и УФ-спектроскопией. Его содержание в целевом продукте 9,7 %. Туберкуло-статическая активность *in vitro* (H37Rv) для полученного полимерного комплекса в пересчете на ГИНК составляла 0,08 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение

Исследовали иммуномодулирующие свойства полииона с Co^{2+} в сравнении ГХТЗ-Со с ГИНК, ХТЗ-Со-ГИНК [10]. Использовали мышей линии СВА трехмесячного возраста, массой 18–20 г. Иммунизация проводилась однократно внутрибрюшинно эритроцитами барана (ЭБ). На пятые сутки после антигенного стимула в селезенке определяли количество антителообразующих клеток (АОК) прямым методом локального гемолиза в агарозе по Эрне [10, 18]. Полимерные комплексы вводили однократно внутрибрюшинно вместе с ЭБ в дозе 25,0 мг/кг. Результаты эксперимента приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Влияние полимерных комплексов ХТЗ на иммунный ответ на эритроциты барана

Исследуемые соединения	Число ядродержащих клеток селезенки (10 ⁹)	Число АОК	КИС	Число мышей
Контроль	135±8	1300±178	-	10
ХТЗ	130±12	3942±180*	2,96	10
ХТЗ-Со	140±8	7000±600*	5,38	10
ХТЗ-Со-ГИНК	126±8	3608±190*	2,93	10
ГХТЗ-Со- ИНГГ	128±9	3801±189	2,92	10

*Примечание. КИС — отношение числа АОК для препарата к числу АОК для контроля; * — статистически достоверное значение по сравнению с контролем.*

Противотуберкулезное действие полимерного комплекса ИНГГа определялось путем изучения средней продолжительности жизни (SPG) животных. SPG оценивали с момента заражения мышей линии СВА массой 18–20 г до их гибели. Животных (55 шт.) заражали внутривенно вирулентной культурой H37Rv 0,1 мг на мышь [10]. Лечение начинали через 12 дней после заражения, регистрируя изменения внутренних органов. К началу лечения индекс патологических изменений легочной ткани у всех животных составлял 2,4. Патологические изменения туберкулезного характера во внутренних органах устанавливали путем окраски мазков-отпечатков по методу Циля-Никольсона на микобактерии туберкулеза. Различия между сравниваемыми средними считали достоверными при $p < 0,05$ (критерий Стьюдента). 15 мышей первой группы лечили раствором ГИНК в дозе 25 мг/кг. Препараты ГХТЗ-Со-ИНГГ животным второй группы вводили внутривенно через каждые 2 суток в равных по ГИНК дозах для первой группы. Животных контрольной группы наблюдали параллельно. В результате средняя продолжительность жизни контрольной группы составила 22 дня, в первой группе — через 32 дня пало 7 животных, а во второй группе — через 43 дня погибло 5 мышей. Эффективность проведенной терапии определяли также по данным оценки внутренних органов [19] (табл. 2).

Эффективность терапии патологических изменений противотуберкулезного характера

Орган	Пораженность в баллах			
	контрольная группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
Легкие	12	8,1	7,6	8,1
Печень	34	11,5	12,0	11,2
Селезенка	29	10,4	11,5	11,2
Сумма	78	30,0	31,5	31,4

Данные проведенного исследования показывают повышенную эффективность нового аналога ГИНК при лечении экспериментального туберкулеза на мышах. Новый полимерный металлокомплекс ГХТЗ-Со-ИНГГ обладает выраженной иммуностимулирующей активностью.

З а к л ю ч е н и е

Проведено сравнительное исследование противотуберкулезной активности аналогов конденсата гидразида изоникотиновой кислоты при лечении экспериментального туберкулеза у мышей. Установлена эффективность использования хлоргидроксихитозанового комплекса с 1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном с включенным Co^{2+} в сравнении с хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном при лечении экспериментального туберкулеза. Выявлена иммуностимулирующая активность полимерного металлокомплекса, сравнимая с комплексом хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидрозоном. Полученные в эксперименте результаты могут использоваться при разработке современных методов лечения туберкулеза.

Настоящая работа выполнена за счет средств авторов.

С п и с о к л и т е р а т у р ы

- 1 Васильева И.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах воз, странах мира и в Российской Федерации. — Ч. 1. Заболеваемость и распространенность туберкулеза / И.А. Васильева, Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов, С.А. Стерликов // Туберкулез и болезни легких. — 2017. — № 95(6). — С. 9–21. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21>.
- 2 Kumar V. Robbins Basic Pathology / V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto. — 8th ed. — Saunders Elsevier, 2007. — 960 p.
- 3 Gibson P.G. Evidence-based respiratory medicine / P.G. Gibson, M. Abramson, R. Wood-Baker, J. Volmink, M. Hensley, U. Costabel. — Oxford: Blackwell, 2005. — 608 p.
- 4 Петров Р.В. Иммунология / Р.В. Петров. — М.: Медицина, 1982. — 368 с.
- 5 Сливкин А.И. Хитозан в качестве полимерной матрицы для иммобилизации лекарственных веществ с противотуберкулезной активностью / А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.А. Болгов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2009. — № 5. — С. 36–39.
- 6 Кузнецов В.А. Хитозан и дезоксирахмал в качестве полимерных матриц для иммобилизации биологически активных компонентов / В.А. Кузнецов // Вестн. МИТХТ. — 2009. — № 3. — С. 42–47.
- 7 Архипов С.А. Антибактериальная эффективность пролонгированной лекарственной формы изониазида в эксперименте / С.А. Архипов, В.А. Шкурупий, Ю.Н. Курунов // Проблемы туберкулеза. — 1997. — № 2. — С. 54–56.
- 8 Шкурупий В.А. Изменения гранулемы при лечении туберкулеза пролонгированной формой изониазида в эксперименте / В.А. Шкурупий, Т.Г. Чернова, Ю.Н. Курунов // Проблемы туберкулеза. — 1993. — № 1. — С. 38–41.
- 9 Арзамасцев А.П. Способ получения 1-изоникотинил-2-D-глюкозилгидраза, обладающего противотуберкулезной активностью / А.П. Арзамасцев // Патент RU 2279438, 10.07.2005.
- 10 Сливкин А.И. Полимерные комплексы гидразида изоникотиновой кислоты противотуберкулезного действия / А.И. Сливкин, В.Л. Лапенко, А.И. Бычук, С.Н. Суслина, Д.А. Сливкин, С.В. Корниенко, А.С. Беленова // Бюл. экспер. биол. и мед. — 2013. — № 6. — С. 728–730.
- 11 Комаров Б.А. Способ получения водорастворимых форм хитозана / Б.А. Комаров, А.И. Албулов / Патент RU 2215749, 10.11.2003 г..
- 12 Обозова Л.А. Устойчивость в водных растворах и биологическая активность комплексов изоникотиноилгидраза и его ацетилпроизводного с Cu (II), Ni (II) и Co (II) / Л.А. Обозова, Н.М. Крымова // Хим.-фармацев. журн. — 1998. — Т. 22. №1. — С. 27–32.
- 13 Рашидова С.Ш. Способ получения полимерных комплексов переходных металлов / С.Ш. Рашидова, В.А. Ли, А.А. Ким // РЖХ. — 1980. — № 22. — С. 447.
- 14 Phyu Phyu, Win et al. Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS) / Win, Phyu Phyu et al. // Carbohydrate Polymers. — 2003. — Vol. 53, No 3. — P. 305–310.

- 15 Хитин и хитозан. Природа, получение и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. — М.: Наука, 2010. — 292 с.
- 16 Шварценбах Г. Комплексонометрическое титрование / Г. Шварценбах, Г. Флашка. — М.: Химия, 1970. — 287 с.
- 17 Hanson J.C. Structure of a copper-isoniazid complex / J.C. Hanson, N. Camerman, A. Camerman // *J Med Chem.* — 1981. — V. 24, No 11. — P. 1369–71.
- 18 Jerne N.K. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells / N.K. Jerne, A.A. Nordin // *Science.* — 1963. — Vol. 140, No 4. — P. 405–407.
- 19 Чернушенко Е.Ф. Макроскопическая оценка поражения внутренних органов морских свинок, зараженных туберкулезом / Е.Ф. Чернушенко, А.А. Чумак, Т.С. Гинзбург // *Проблемы туберкулеза.* — 1984. — № 5. — С. 53–55.

А.И. Сливкин, А.С. Беленова, С.В. Корниенко, Н.А. Дьякова, Ю.В. Добрина

Туберкулезгекарсы және иммунокүшейтуші әсері бар изоникотин қышқылы гидразидінің жаңа полимерлік кешендері

Туберкулез әлеуметтік маңызды аурулардың біріне жатады. Ғылыми әдебиеттерде фагоцитоздың аяқталуына ықпал ететін туберкулезгекарсы препараттарды иммобилизациялау үшін полимерлі матрицаларды қолданудың орындылығы негізделген. Тышқандардағы эксперименттік туберкулезді емдеу кезінде изоникотин қышқылы гидразидінің конденсаты аналогтарының туберкулезгекарсы белсенділігіне салыстырмалы зерттеу жүргізілді. Эксперименттік туберкулезді емдеу кезінде хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-Д-глюкозилгидрозонмен салыстырғанда $Co_2 +$ қосылған 1-изоникотинил-2-Д-глюкозилгидрозоны бар хлоргидроксихитозан кешенін пайдаланудың тиімділігі анықталды. Хитозан-кобальт-1-изоникотинил-2-Д-глюкозилгидрозон кешенімен салыстырылатын полимерлік металл кешенінің иммунокүшейткіш белсенділігі анықталды. Экспериментте алынған нәтижелер туберкулезді емдеудің қазіргі заманғы әдістерін әзірлеу кезінде пайдаланылуы мүмкін.

Кілт сөздер: туберкулез, полимерлік металл кешені, хитозан, изониазид.

A.I. Slivkin, A.S. Belenova, S.V. Kornienko, N.A. Dyakova, Yu.V. Dobrina

New polymer complexes of isonicotinic acid hydrazide with anti-tuberculosis and immunostimulating effects

Tuberculosis refers to one of the socially significant diseases. The scientific literature justifies the feasibility of using polymer matrices to immobilize protuberculous drugs, which contributes to the completion of phagocytosis. Comparative study of antituberculosis activity of analogues of isonicotinic acid hydrazide condensate in treatment of experimental tuberculosis in mice was carried out. The effectiveness of using chlorohydroxychitosan complex with 1-isonicotinyl-2-D-glucosyl hydrosone with included $Co_2 +$ has been established in comparison with chitosan-cobalt-1-isonicotinyl-2-D-glucosyl hydrosone in treating experimental tuberculosis. Immunostimulatory activity of polymer metal complex comparable to chitosan-cobalt-1-isonicotinyl-2-D-glucosyl hydrosone complex was revealed. The results obtained in the experiment can be used in the development of modern, treatment methods for tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, polymer metal complex, chitosan, isoniazid.

References

- 1 Vasileva, I.A., Belilovskii, E.M., Borisov, S.E., & Sterlikov, S.A. (2017). Zaboлеваemost, smertnost i rasprostranennost kak pokazateli bremeni tuberkuleza v regionakh voz, stranakh mira i v Rossiiskoi Federatsii. Chast 1. Zaboлеваemost i rasprostranennost tuberkuleza [Incidence, mortality and prevalence as indicators of TB burden in WHO regions, countries of the world and in the Russian Federation. Part 1. Incidence and prevalence of tuberculosis]. *Tuberkulez i bolezni legkikh — Tuberculosis and lung diseases*, 95(6); 9–21. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2017-95-6-9-21> [in Russian].
- 2 Kumar, V., Abbas, A.K., & Fausto, N. (2007). *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Saunders Elsevier.
- 3 Gibson, P.G., Abramson, M., Wood-Baker, R., Volmink, J., Hensley, M., & Costabel, U. (2005). *Evidence-based respiratory medicine*. Oxford: Blackwell.
- 4 Petrov, R.V. (1982). *Immunologiya [Immunology]*. Moscow: Meditsina [in Russian].
- 5 Slivkin, A.I., Lapenko, V.L., & Bolgov, A.A. (2009). Hitozan v kachestve polimernoii matritsy dlia immobilizatsii lekarstvennykh veshchestv s protivotuberkuleznoi aktivnostiu [Chitosan as a polymer matrix for immobilization of drugs with anti-tuberculosis activity]. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevicheskoi khimii — Issues of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 5, 36–39 [in Russian].

- 6 Kuznecov, V.A. (2009). Hitozan i dezoksikrakhmal v kachestve polimernykh matrity dlia immobilizatsii biologicheski aktivnykh komponentov [Chitosan and deoxykrachmal as polymer matrices for immobilization of biologically active components]. *Vestnik Moskovskoi gosudarstvennoi akademii tonkoi khimicheskoi tekhnologii — Bulletin of Moscow State Academy of Fine Chemical Technology*, 3, 42–47 [in Russian].
- 7 Arkhipov, S.A., Shkurupii, V.A., & Kurunov, Yu.N. (1997). Antibakterialnaia effektivnost prolongirovannoi lekarstvennoi formy izoniazida v eksperimente [Antibacterial efficacy of extended dosage form of isoniazid in experiment]. *Problemy tuberkuleza — Tuberculosis problems*, 2, 54–56 [in Russian].
- 8 Shkurupii, V.A., Chernova, T.G., & Kurunov, Yu.N. (1993). Izmeneniia granulemy pri lechenii tuberkuleza prolongirovannoi formoi izoniazida v eksperimente [Changes in granuloma in the treatment of tuberculosis with a prolonged form of isoniazid in the experiment]. *Problemy tuberkuleza — Problems of tuberculosis*, 1, 38–41 [in Russian].
- 9 Arzamastsev, A.P. (2005). Sposob polucheniia 1-izonikotinil-2-D-gliukoziilgidrazona, obladaiushchego protivotuberkuleznoi aktivnostiu [A method of producing 1-isonicotinyl-2-D-glucosyl hydrazone having antituberculosis activity]. Patent RU 2279438, 10.07.2005 [in Russian].
- 10 Slivkin, A.I., Lapenko, V.L., Bychuk, A.I., Suslina, S.N., Slivkin, D.A., Kornienko, S.V., & Belenova, A.S. (2013). Polimerne kompleksy gidrazida izonikotinovoi kisloty protivotuberkuleznogo deistviia [Polymer complexes of isonicotinic acid hydrazide of antituberculous action]. *Biulleten eksperimentalnoi biologii i meditsiny — Bulletin of experimental biology and medicine*, 6, 728–730 [in Russian].
- 11 Komarov, B.A. & Albulov, A.I. (2003). Sposob polucheniia vodorastvorimykh form khitozana [Method for preparing water-soluble forms of chitosan]. Patent RU 2215749, 10.11.2003 [in Russian].
- 12 Obozova, L.A. & Krymova, N.M. (1998). Ustoichivost v vodnykh rastvorakh i biologicheskaiia aktivnost kompleksov izonikotinoilgidrazina i ego atsetilproizvodnogo s Cu (II), Ni (II) i Co (II) [Stability in aqueous solutions and biological activity of complexes of isonicotinoyl hydrazine and its acetyl derivative with Cu (II), Ni (II) and Co (II)]. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal — Chemical and Pharmaceutical Journal*, 22(1), 27–32 [in Russian].
- 13 Rashidova, S.Sh., Li, V.A., & Kim, A.A. (1980). Sposob polucheniia polimernykh kompleksov perekhodnykh [A method of producing polymer complexes of transition metals]. *Referativnyi zhurnal po khimii — Referential Journal in Chemistry*, 22, 447 [in Russian].
- 14 Phyu Phyu, Win et al. (2003). Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS). *Carbohydrate Polymers*, 53(3); 305–310.
- 15 Skryabina, K.G., Vihorevoi, G.A., & Varlamova, V.P. (2010). *Khitin i khitozan. Priroda, poluchenie i primeneniie [Hitin and chitosan. Nature, production and application]*. Moscow: Nauka [in Russian].
- 16 Shvarcenbakh, G. & Flashka, G. (1970). *Kompleksonometricheskoe titrovaniie [Complexometric titration]*. Moscow: Khimiia [in Russian].
- 17 Hanson, J.C., Camerman, N., & Camerman, A. (1981). Structure of a copper-isoniazid complex. *J Med Chem.*, 24(11); 1369–1371.
- 18 Jerne, N.K. & Nordin, A.A. (1963). Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 140(4); 405–407.
- 19 Chernushenko, E.F., Chumak, A.A., & Ginzburg, T.S. (1984). Makroskopicheskaiia otsenka porazheniia vnutrennikh organov morskiikh svinok, zarazhennykh tuberkulyozom [Macroscopic assessment of damage to internal organs of guinea pigs infected with tuberculosis]. *Problemy tuberkuleza — Tuberculosis problems*, 5, 53–55 [in Russian].

Information about authors

- Slivkin, Alexey Ivanovich** — Doctor of pharmaceutical sciences, Professor, Head of Department of Pharmaceutical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russia; slivkin@pharm.vsu.ru;
- Belenova, Alyena Sergeevna** — Candidate of biological sciences, Docent of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; belenova@pharm.vsu.ru;
- Kornienko, Sergey Vasiljevich** — Candidate of medical sciences, Chief Doctor, Voronezh Regional Clinical TB Dispensary named after N.S. Pokhvisneva, Voronezh, Russia; mail4@vokptd.zdrav36.ru;
- Dyakova, Nina Alexeevna** — Candidate of biological sciences, Assistant of Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; ninochka_V89@mail.ru;
- Dobrina, Yulia Vladimirovna** — Assistant of Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Technology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; dobrina@pharm.vsu.ru.