

Г.Н. Можокина<sup>1\*</sup>, Н.А. Елистратова<sup>1</sup>, И.П. Соловьева<sup>1</sup>, А.С. Гуцин<sup>2</sup>, В.Н. Елохина<sup>2</sup>

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ КЛАССА ТИОСЕМИКАРБАЗОНОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова", 119991, г. Москва, Россия; НИИ фтизиопульмонологии, 127994, г. Москва, Россия; <sup>2</sup>ОАО "Фармасинтез", 664007, г. Иркутск, Россия

\*Можокина Галина Николаевна. E-mail: mojokina@mail.ru

♦ Представлены результаты экспериментального изучения противотуберкулезной активности новой соли тиосемикарбазона (Phs-205) в сравнении с субстанцией перхлорона (перхлорат-4-тиоуреидоиминотетил-пиридиния). На модели генерализованного туберкулеза мышей оценивали противотуберкулезную активность Phs-205 в дозах 10, 20 и 30 мг/кг и перхлорона в дозе 20 мг/кг по патоморфологическим и микробиологическим критериям. Общетоксическое действие на мышей Phs-205 и перхлорона в использованных дозах оценивали по биохимическим и патоморфологическим параметрам.

Установлено, что Phs-205 в дозе 30 мг/кг оказывает наиболее выраженное протективное и терапевтическое действие при экспериментальном туберкулезе, вызванном микобактериями туберкулеза человеческого типа штамма H37Rv. Данные биохимических исследований свидетельствуют о более выраженном токсическом влиянии перхлорона на показатели белкового и липидного обмена.

**Ключевые слова:** противотуберкулезные препараты; тиосемикарбазоны; перхлорон; экспериментальный туберкулез; противотуберкулезная активность

G.N. Mojokina<sup>1,2</sup>, N.A. Elistratova<sup>1,2</sup>, I.P. Soloviyeva<sup>1,2</sup>, A.S. Guschin<sup>2</sup>, V.N. Elokhina<sup>2</sup>

### THE PERSPECTIVES OF APPLICATION OF NEW COMPOUNDS OF THIOSEMICARBAZONES CLASS WITH PURPOSE TO DEVELOP PHARMACEUTICALS WITH ANTI TUBERCULOSIS ACTIVITY

<sup>1</sup>The I.M. Sechenov first Moscow medical university of Minzdrav of Russia, 119992, Moscow, Russia

<sup>2</sup>The research institute of phthisiopulmonology, 127994 Moscow, Russia

<sup>3</sup>"The Pharmasynthesis", 664007 Irkutsk, Russia

♦ The article deals with the results of experimental study of anti tuberculosis activity of new salt thiosemicarbazone (Phs-205) in comparison with substance of perhloson (perchlorate-4-thioureidoiminomethyl-pyridinium).

The model of generalized tuberculosis of mice was used to evaluate anti tuberculosis activity of Phs-205 in dosage of 10, 20 and 30 mg/kg and perhloson in dosage of 20 mg/kg according pathomorphological and microbiological criteria. It is established that Phs-205 in dosage of 30 mg/kg has the most expressed protective and therapeutic effect under experimental tuberculosis caused by mycobacterium of tuberculosis of human type H37Rv. The results of biochemical study testify the more expressed toxic effect of perhloson upon indicators of protein and lipid metabolism.

**Keywords:** anti tuberculosis pharmaceuticals; thiosemicarbazone; perhloson; experimental tuberculosis; anti tuberculosis activity

Распространение штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью на фоне ограниченного арсенала противотуберкулезных препаратов ставит под угрозу успех мероприятий по борьбе с туберкулезом и диктует необходимость создания новых противотуберкулезных средств.

Перспективным путем повышения эффективности лечения туберкулеза является создание противотуберкулезных препаратов на основе химической модификации известных структур. В 50—60-х годах XX века были синтезированы соединения из класса тиосемикарбазонов, обладающих противотуберкулезной активностью [1], и созданы лекарственные препараты (тибон, тиацетазон), которые в настоящее время не используются из-за низкой эффективности и высокой токсичности. В Иркутском институте химии СО РАН разработаны новые соединения производных класса тиосемикарбазонов. На основе перхлорат 4-тиоуреидоиминотетилпиридиния был создан лекарственный препарат Перхлорон (ОАО "Фармасинтез", Иркутск), оказывающий выраженное, строго избирательное ингибирующее действие на жизнеспособность микобактерий туберкулеза (МБТ), особенно в отношении микобактерий бычьего типа. На моделях экспериментально-

го туберкулеза доказан протективный и терапевтический эффект перхлорона в условиях монотерапии, способность активировать фагоцитарную функцию макрофагов и усиливать лечебные свойства противотуберкулезных препаратов [2, 3]. Препарат разрешен для клинических испытаний и получен первый опыт его применения у больных туберкулезом [4].

В настоящее время при скрининге ряда новых соединений из класса тиосемикарбазонов на противотуберкулезную активность выделен образец с условным обозначением Phs-205, проявивший высокую активность в отношении лабораторных штаммов микобактерий человеческого и бычьего типов.

Целью данного исследования явилось изучение противотуберкулезной эффективности и безопасности Phs-205 в сравнении с таковой перхлорона на модели туберкулеза мышей.

Исследования проведены на 80 белых нелинейных мышцах-самках массой 26—32 г (питомник "Андреевка", РАМН), которым внутривенно вводили культуру МБТ лабораторного штамма (H37Rv). Лечение животных начинали на 16-й день от момента заражения после выявления на контрольных вскрытиях макроскопически подтверж-

денных очагов специфического воспаления в легких. Животные были разделены на 5 групп: 4 опытные в соответствии с дозами вводимых препаратов и 1 контрольная — зараженные нелеченые мыши.

Phs-205 испытывали в трех дозах (10, 20 и 30 мг/кг), перхлорон в дозе 20 мг/кг при введении внутривенно с помощью асептического металлического зонда. Навески препаратов готовили *ex tempore* в 1 % крахмальном геле. Препараты вводили однократно ежедневно, без перерывов, в течение 28 дней. Зараженным нелеченым мышам в течение этого времени вводили изотонический раствор хлорида натрия. В течение исследования проводили осмотр животных, регистрировали поведенческие реакции, потребление кормов и воды. После окончания курса введения препаратов мышам умерщвляли путем декапитации с одновременным забором крови для проведения биохимических исследований. Эффективность химиотерапии оценивали по выживаемости мышей, изменению массы тела и весовых индексов внутренних органов, результатам патоморфологического, гистологического и микробиологического исследований. Для оценки общетоксического действия Phs-205 и перхлорона определяли в крови активность трансаминаз (АЛТ, АСТ, ед/л), содержание общего и прямого билирубина (в мкмоль/л), креатинина (в мкмоль/л), холестерина (в мкмоль/л), мочевины (в мкмоль/л). Исследование проводили на биохимическом анализаторе Sapfir-400 с использованием реактивов фирмы Diasys. Для сравнения использовали кровь от зараженных нелеченых и интактных мышей. Проводили статистическую обработку полученных результатов. Достоверность различий между группами наблюдений оценивали по критерию Стьюдента (Г.Ф. Лакин, 1980; Г.Г. Автандилов, 1980).

К концу эксперимента летальность в группе контроля (зараженные, нелеченые животные) составила 60%. Лечение Phs-205 в дозе 30, 20, 10 мг/кг снизило летальность мышей до 6,6, 13,3, 26,6% соответственно. Наиболее высокий индекс эффективности по снижению летальности (89%) отмечен при использовании Phs-205 в дозе 30 мг/кг. При использовании перхлорона в дозе 20 мг/кг летальность снизилась до 40%, а индекс эффективности составил 33,3%.

Защитное действие Phs-205 в дозе 30 мг/кг выразилось в сохранении массы тела мышей. При использовании Phs-205 в дозах 10 и 20 мг/кг и перхлорона отмечено достоверное снижение массы тела мышей по сравнению с исходной. В группе зараженных нелеченых животных потеря массы тела была также значительной.

При вскрытии мышей наименьшие видимые морфологические изменения легких были у мышей, получавших Phs-205 в дозах 30 и 20 мг/кг. При использовании Phs-205 в дозе 10 мг/кг и перхлорона выраженность поражения легких была схожей. Значения весовых индексов внутренних органов мышей из опытных групп, пролеченных Phs-205 или перхлоронном, достоверно не отличались от таковых у нелеченых животных.

При гистологических исследованиях легких зараженных нелеченых мышей выявлены выраженные мелко-, средне- и крупноочаговые инфильтративно-пневмонические изменения в виде диффузно-очаговых лимфомакрофагальных скоплений, расположенных субплеврально, перибронхиально и интерстициально. В некоторых крупных очагах имелись выраженные участки казеоза. В ткани печени, почек и селезенки отмечалась значительная диссеминация мелких лимфоцитарных гранул.

В гистологических препаратах легких мышей, получавших лечение Phs-205, отмечено сохранение архитектоники легочной ткани. В перибронхиальной ткани отдельных бронхов, в интерстиции, периваскулярно встречались ограниченные лимфомакрофагальные скопления различных размеров: мелкие — при применении Phs-205 в дозе 30 мг/кг, средние — при дозе 20 мг/кг и разнока-

либерные — при дозе 10 мг/кг. В ткани печени мышей, получавших Phs-205, перивенулярно встречались лимфоцитарные скопления и немногочисленные лимфоцитарные мелкие гранулы. Отмечались проявления дистрофических изменений: от дискомплексации печеночных балок, выраженной белковой дистрофии гепатоцитов при использовании дозы 30 мг/кг до умеренно выраженной гидропической дистрофии гепатоцитов при дозе 10 мг/кг. В селезенке мышей определялись слабовыраженная гиперплазия белой пульпы и единичные в препарате мелкие эпителиоидно-клеточные гранулы. В ткани почек имела место слабовыраженная гидропическая дистрофия извитых канальцев, проявлений туберкулезной диссеминации не выявлено.

В гистологических препаратах легких мышей, получавших перхлорон, также сохранялась архитектоника легочной ткани. Встречались немногочисленные субмикроскопические гранулы. В перибронхиальной ткани местами отмечено наличие умеренной лимфоцитарной инфильтрации с небольшой примесью плазматических клеток. В ткани печени наблюдались немногочисленные субмикроскопические лимфоцитарные гранулы на фоне умеренно выраженной гидропической дистрофии гепатоцитов. В ткани почек обнаружена слабовыраженная гидропическая дистрофия извитых канальцев, проявлений туберкулезной диссеминации не отмечено. В препаратах селезенки определялись слабовыраженная гиперплазия белой пульпы и единичные в препарате мелкие эпителиоидно-клеточные гранулы.

Установлен дозозависимый эффект при применении Phs-205: с уменьшением дозы препарата увеличивается объемная площадь поражения легких туберкулезным воспалением (с  $1,93 \pm 0,39$  до  $6,27 \pm 0,85\%$ ). Коэффициент терапевтической эффективности по этому показателю был также самый высокий при использовании Phs-205 в дозе 30 мг на 1 кг массы и составил 95,2%. У мышей, получавших перхлорон, коэффициент эффективности составил 33,3%, а объемная площадь поражения легких туберкулезным воспалением существенно не отличалась от таковой у нелеченых животных.

Анализ результатов микробиологических исследований показал, что лечение мышей Phs-205 в дозе 30 мг/кг привело к существенному снижению высеваемости МБТ из всех исследованных органов. Индекс эффективности по снижению высеваемости МБТ по сравнению с зараженными нелечеными животными составил от 58,8 до 70,3% (рис. 1). С уменьшением дозы Phs-205 снижались индексы эффективности высеваемости из легких, пече-

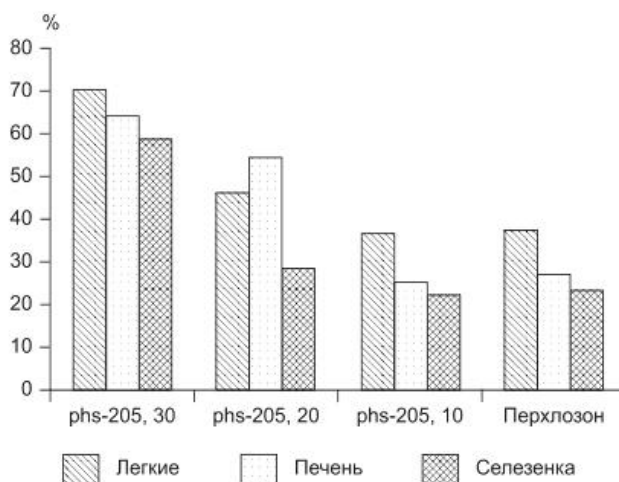


Рис. 1. Индекс эффективности (%) по снижению высеваемости МБТ из легких, печени, селезенки мышей опытных групп по отношению к зараженным нелеченым мышам.

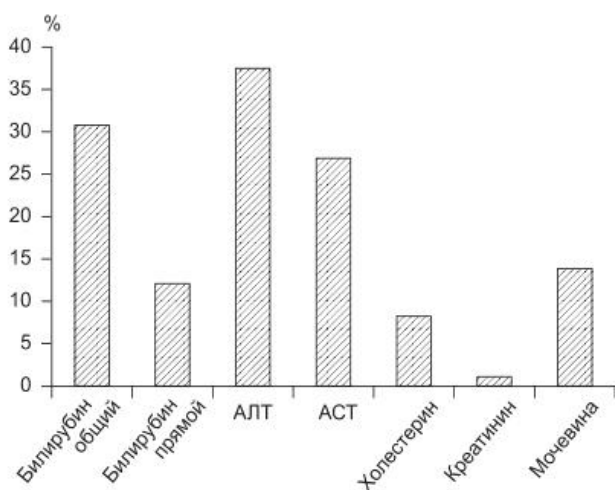


Рис. 2. Отклонение биохимических показателей крови у зараженных нелеченных мышей по отношению к интактным животным.

ни, селезенки: соответственно 46,2, 54,5, 28,5% при дозе 20 мг/кг и 36,6, 25,2, 22,3% при дозе 10 мг/кг. Использование перхлорона привело к достоверному снижению высеваемости МБТ из легких и печени по сравнению с зараженными нелечеными. Индекс эффективности составил 37,4 и 27,1%. По индексу эффективности использование перхлорона было равноценным результату лечения Phs-205 в дозе 10 мг/кг.

Таким образом, наиболее высокий микробиологический эффект наблюдался при использовании Phs-205 в дозе 30 мг/кг.

По данным литературы [5], применение перхлорона у здоровых крыс в дозе 20 мг/кг в течение 2 нед сопровождалось повышением уровня креатинина на 68%, активности АЛТ (на 31%), АСТ (в 1,5 раза), содержания билирубина (на 28%), холестерина (на 64%), мочевины (на 34%). В нашем исследовании применение Phs-205 в дозах 10-30 мг/кг и перхлорона в дозе 20 мг/кг в течение 28 дней привело к изменению изученных биохимических показателей по сравнению с таковыми у зараженных нелеченых и интактных животных (рис. 2—4).

У зараженных нелеченых животных отмечено значительное повышение содержания общего билирубина (на 30,9%), активности АЛТ (на 37,6%), АСТ (на 27%), что свидетельствует о нарушении функционального состояния печени. Различия в показателях белкового и липидного обмена по сравнению с интактными животными были менее значимыми: повышение содержания холестерина на 8,3%; креатинина — на 1,2%, мочевины — на 14%.

На фоне экспериментального лечения отмечено значительное снижение по сравнению с зараженными нелечеными мышами показателей активности трансаминаз, особенно у мышей, получавших Phs-205 в дозах 10—30 мг/кг. Так, активность АЛТ снизилась на 23—23,5% при использовании Phs-205 в дозах 30 и 20 мг/кг и на 48,3% при дозе 10 мг/кг. Активность АСТ снизилась на 28—25,8% при использовании Phs-205 в дозах 30 и 20 мг/кг и на 38,2% при дозе 10 мг/кг. При использовании перхлорона активность трансаминаз снизилась незначительно: на 12% АЛТ и на 10% АСТ.

На фоне лечения отмечается повышение содержания холестерина по сравнению с таковым у нелеченых животных, особенно выраженное у мышей, получавших перхлорон (на 82%). Изменение содержания мочевины по сравнению с таковым у нелеченых мышей было неоднозначным: повысилось на 27% при применении перхлорона, снизилось на 3, 14, 20,8% при использовании Phs-205 в дозах 30, 20, 10 мг/кг соответственно.

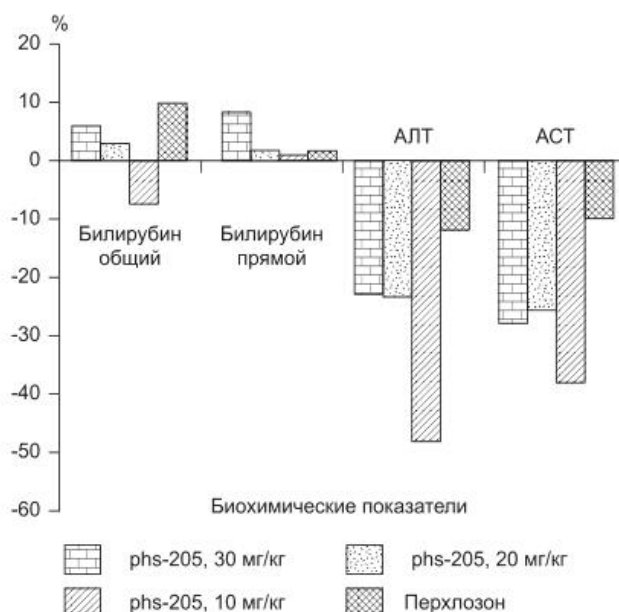


Рис. 3. Отклонение биохимических показателей функциональной активности печени у мышей опытных групп по отношению к зараженным нелеченым животным.

Таким образом, данные биохимических исследований свидетельствуют о более выраженном токсическом влиянии перхлорона на показатели белкового и липидного обмена. Тем не менее в гистологических препаратах печени и почек мышей, получавших Phs-205 во всех дозах, отмечались проявления гидропической дистрофии гепатоцитов от умеренной до слабой степени выраженности и слабовыраженная гидропическая дистрофия извитых канальцев почек. Аналогичные изменения были характерны для печени и почек мышей, получавших перхлорон.

На основании полученных результатов сравнительного изучения Phs-205 и перхлорона можно заключить, что соединение Phs-205 в дозе 30 мг/кг оказывает наиболее выраженное лечебное действие при экспериментальном

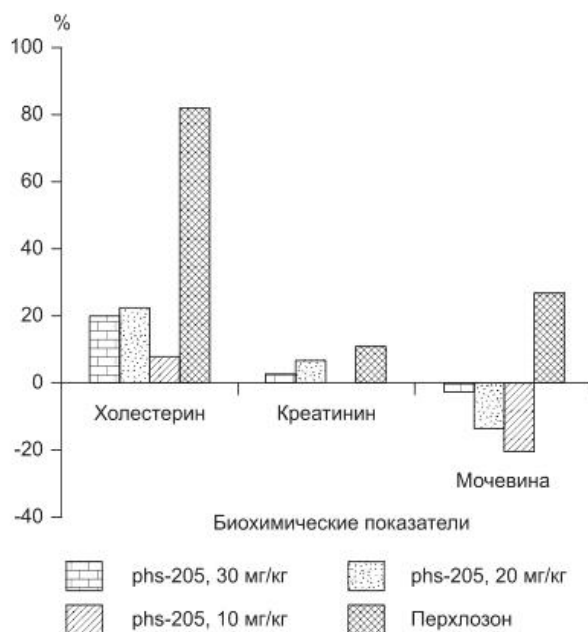


Рис. 4. Отклонение показателей белкового и липидного обмена у мышей опытных групп по отношению к зараженным нелеченым животным.

туберкулезе, вызванном микобактериями туберкулеза штамма H37Rv.

Представляется перспективным дальнейшее изучение Phs-205 в дозе 30 мг/кг в схемах комплексной химиотерапии экспериментального туберкулеза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Химия и медицина. Тиосемикарбазоны. М.: Медгиз; 1954.
2. Виноградова Т.И., Александрова А.Е., Еreshko С.В., Елохина В.Н., Нахманович А.С. "Перхлозон" — новое соединение, обладающее выраженной противотуберкулезной активностью. В кн.: *Химия лекарственных веществ*. СПб.; 1994.
3. Виноградова Т.И., Александрова А.Е., Антоненкова Е.В., Елохина В.Н., Нахманович А.С. Конструирование и исследование новых веществ, обладающих противотуберкулезной активностью: оригинальное соединение "перхлозон" как возможное средство этиотропной терапии туберкулеза. *Проблемы туберкулеза*. 1999; 3: 45—7.
4. Яблонский П.К., Павлова М.В., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Арчакова Л.И., Малыгина Е.И. и др. Первый опыт применения нового противотуберкулезного препарата Перхлозон® во фтизиатрии. В кн.: *Совершенствование медицинской помощи больным туберкулезом: Материалы Всероссийской научно-практической конференции*. СПб; 2011: 269—70.
5. Самбурова З.Г., Малханова Г.Н., Павлов И.А., Гуляев С.М., Мондодоев А.Г., Николаев С.М. и др. Влияние липосомальной фор-

мы перхлозона на морфофункциональное состояние печени и почек у белых крыс. *Сибирский медицинский журнал*. 2009; 4: 24—6.

#### REFERENCES

1. *Chemistry and medicine. Thiosemicarbazone*. Moscow: Medgiz; 1954 (in Russian).
2. Vinogradova T.I., Aleksandrov A.E., Ereshko S.V., Elokhina V.N., Nakhmanovich A.S. et al. "Perhlozon" — a new compound having expressed antituberculosis activity. In: *Khimiya lekarstvennykh veshchestv*. St. Petersburg; 1994 (in Russian).
3. Vinogradov T.I., Aleksandrova A.E., Antonenkova E.V., Elokhina V.N., Nakhmanovich A.S. et al. Design and investigation of new substances with anti-tuberculosis activity: original connection "perhlozon" as a possible causal treatment of TB. *Problemy tuberkuliza*. 1999; 3 45—7 (in Russian).
4. Yablonskiy P.K., Pavlov M.V., Vinogradova T.I., Zabolotnykh N.V., Archakova L.I., Malygina E.I. et al. First experience of a new anti-drug PERHLOZON® in phthisiology. In: *Sovershenstvovanie meditsinskoy pomoshchi bol'nym tuberkulezom*. St. Petersburg; 2011: 269—70 (in Russian).
5. Sambueva Z.G., Malkhanova G.N., Pavlov I.A., Gulyaev S.M., Mondodoev A.G., Nikolaev S.M. et al. Influence of liposomal form perhlozona on morphofunctional state of the liver and kidneys of white rats. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 4: 24—6.

Поступила 06.09.13  
Received 06.09.13