



Исследование элюционных характеристик противотуберкулезных препаратов, смешанных с костным цементом

Е. О. ПЕРЕЦМАНАС¹, А. А. АРТЮХОВ², М. И. ШТИЛЬМАН², И. В. ЕСИН¹, В. С. ЗУБИКОВ¹, И. А. ГЕРАСИМОВ¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, РФ

²ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева» Минобрнауки РФ, Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценка элюционных характеристик противотуберкулезных препаратов (изониазид, циклосерин, рифампицин, амикацин, канамицин, этамбутол), загруженных в образцы костного цемента и помещенных в жидкую среду для определения возможности использования подобных систем в качестве депо препарата.

Материалы и методы. Для исследования *in vitro* использовались химически чистые субстанции препаратов. Для изучения кинетики элюции препаратов применялся спектрофотометрический метод. Проведен анализ спектров поглощения препаратов в видимой и ультрафиолетовой области для выявления максимумов поглощения, и оценена устойчивость химической структуры препаратов к нагреванию. Далее изучена динамика выделения препаратов из образцов отвержденного костного цемента в статических условиях.

Результаты. Получены удовлетворительные показатели термостабильности и элюции изучаемых препаратов, что позволяет использовать их в смеси с костным цементом.

Ключевые слова: элюция, спектры поглощения, устойчивость к нагреванию, противотуберкулезные препараты, костный цемент

Для цитирования: Перецманас Е. О., Артюхов А. А., Штильман М. И., Есин И. В., Зубиков В. С., Герасимов И. А. Исследование элюционных характеристик противотуберкулезных препаратов, смешанных с костным цементом // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2021. – Т. 99, № 4. – С. 30-35. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-4-30-35>

Study of elution characteristics of anti-tuberculosis drugs mixed with bone cement

E. O. PERETSMANAS¹, A. A. ARTYUKHOV², M. I. SHTILMAN², I. V. ESIN¹, V. S. ZUBIKOV¹, I. A. GERASIMOV¹

¹National Medical Research Center of Phthiisopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

²Mendeleev University of Chemical Technology, Russia

ABSTRACT

The objective: to assess the elution characteristics of anti-tuberculosis drugs (isoniazid, cycloserine, rifampicin, amikacin, kanamycin, ethambutol) placed into bone cement samples and put in a liquid medium to determine the possibility of using such systems as a drug reservoir.

Subjects and methods. For *in vitro* studies, pure substances of the drugs were used. The spectrophotometry was used to study the elution kinetics of the drugs. Absorption spectra of the drugs in the visible and ultraviolet regions were analyzed to reveal the absorption maxima, and the resistance of the chemical structure of the drugs to heating was assessed. Further, the changes of drug release from hardened bone cement samples under static conditions were studied.

Results. It has been found that studied drugs demonstrated satisfactory parameters of thermal stability and elution which makes it possible to use them in a mixture with bone cement.

Key words: elution, absorption spectra, resistance to heat, anti-tuberculosis drugs, bone cement

For citations: Peretsmanas E.O., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Esin I.V., Zubikov V.S., Gerasimov I.A. Study of elution characteristics of anti-tuberculosis drugs mixed with bone cement. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2021, Vol. 99, no. 4, P. 30-35. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2021-99-4-30-35>

Для корреспонденции:

Перецманас Евгений Оркович
E-mail: peretsmanas58@mail.ru

Correspondence:

Evgeniy O. Peretsmanas
Email: peretsmanas58@mail.ru

Применение цементных спейсеров, нагруженных антимикробными препаратами с известной противотуберкулезной активностью, при двухэтапном эндопротезировании суставов при туберкулезном артрите становится одним из перспективных направлений фтизиоортопедии [3]. Методика привлекает внимание возможностью значительно улучшить качество жизни больных за счет восстановления опорно-двигательной функции поврежденного сустава до момента установки постоянного эндо-

протеза и локально оказывать антибактериальное действие на микробный агент [2-4]. Используемые для этого лекарственные препараты должны обладать следующими свойствами: термостойкость, высокая растворимость, способность к длительному элюированию и созданию лечебной антимикробной концентрации в жидкой среде, наличие (для смешивания с цементом) порошковой формы с прописанной в инструкции возможностью внутривенного введения раствора, из нее приготовленного,

что является гарантией ее стерильности в упаковке [1, 2, 6]. По данным публикаций, отвечающих этим требованиям, препаратами с противотуберкулезной активностью являются: изониазид, канамицин, стрептомицин, амикацин, капреомицин, левофлоксацин, моксифлоксацин, амоксицилин (амоксицилин с клавулановой кислотой), меропенем и, с определенными условиями, рифампицин [4, 5, 7, 8].

Цель исследования: оценка элюционных характеристик противотуберкулезных препаратов (изониазид, циклосерин, рифампицин, амикацин, канамицин, этамбутол), загруженных в образцы костного цемента и помещенных в жидкую среду для определения возможности использования подобных систем в качестве депо препарата.

Материалы и методы

Для исследования *in vitro* использовались химически чистые субстанции изониазида, циклосерина, рифампицина, амикацина, канамицина, этамбутола. Три дозы каждого препарата (0,1; 0,2 и 0,3 г) смешивали с 4 г костного цемента Семех. Образцы получали в виде цилиндров диаметром 19 мм, в качестве формы использовались трехкомпонентные шприцы Plastipack 20 (рис. 1).



Рис. 1. Цилиндрический образец цемента, смешанного с антимикробным препаратом

Fig. 1. A cylindrical sample of cement mixed with an antimicrobial agent

Для изучения кинетики элюции препарата использовался спектрофотометрический метод анализа. На первом этапе проведен анализ спектров экстинкции препарата в видимой и ультрафиолетовой области для выявления максимумов поглощения, оценена устойчивость химической структуры препарата к нагреванию. Согласно «Временной инструкции по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре» И 42-2-82 и ASTM F1980-07

(Standard Guide for Accelerated Aging of Sterile Barrier Systems for Medical Devices), коэффициент соответствия между временем хранения при различных температурах определялся по формуле:

$$K = A^{\frac{t-t_0}{10}}$$

где коэффициент А, как правило, принимается равным 2. Таким образом, инкубирование препарата в водном растворе при температуре 80°C в течение 36 ч примерно соответствует инкубированию при 37°C в течение 30 сут. На втором этапе проводилось изучение динамики выделения препарата из образца отвержденного костного цемента в статических условиях. Для этого образец с препаратом помещали в физиологический раствор и инкубировали при 37°C. Соотношение объема образца и жидкой среды составляло 1 к 10. Замену физиологического раствора осуществляли через 1, 3, 7, 14 и 28 дней. Перед заменой раствора в нем определяли концентрацию препарата спектрофотометрическим методом. Для подтверждения отсутствия значимых изменений в структуре лекарственного препарата, способных влиять на точность определения концентрации растворов, снимали также спектры экстинкции в интервале длин волн от 190 до 900 нм.

Результаты исследования

В спектрах поглощения всех препаратов, за исключением рифампицина, не наблюдалось максимумов поглощения в видимой области спектра. В спектрах изониазида и D-циклосерина наблюдалось от одного до трех максимумов поглощения в областях 208-300 нм. В спектрах поглощения этамбутол дигидрохлорида, канамицин сульфата, амикацин дисульфата не обнаружено явно выраженных максимумов поглощения в изучаемых интервалах (от 190 нм) (рис. 2).

На основании полученных данных определены длины волн для проведения измерений для каждого препарата (табл. 1).

Таблица 1. Длины волн, при которых производились измерения для определения концентрации препарата в растворе

Table 1. Wavelengths at which measurements were made to determine the concentration of the drug in solution

Препарат	Длина волны, λ, нм	Препарат	Длина волны, λ, нм
Изониазид	260	канамицин сульфат	268
D-циклосерин	229	амикацин дисульфат	268
Этамбутол дигидрохлорида	268	рифампицин	475

Для препаратов, имеющих один максимум поглощения (изониазид, D-циклосерин), измерения проводились при длине волны, соответствующей максимуму. Для препаратов, имеющих несколько максимумов поглощения (рифампицин), это

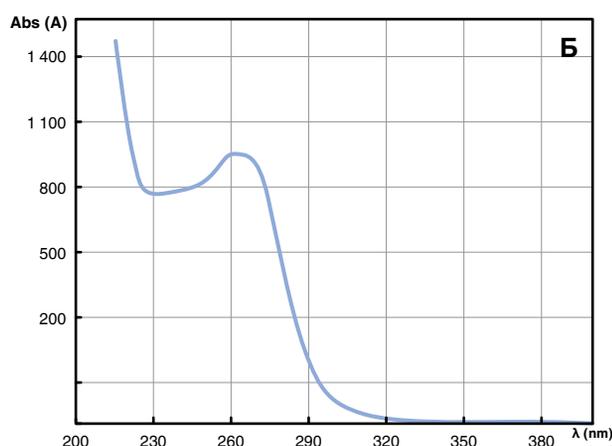
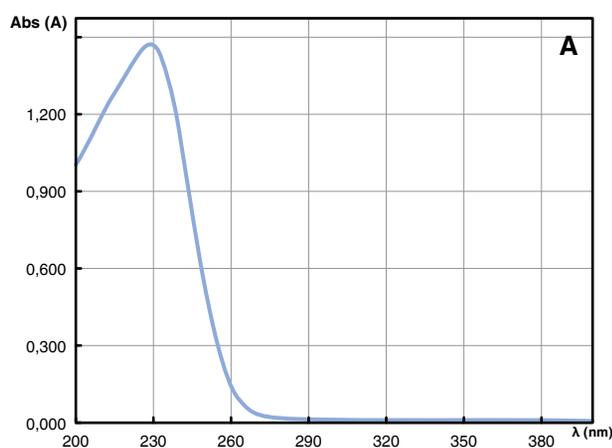


Рис. 2. Спектры поглощения изониазида (А), D-циклосерина (Б)

Fig. 2. Absorption spectra of isoniazid (A), D-cycloserine (B)

была длина волны, соответствующая максимуму в видимой части спектра или средневолновой ультрафиолетовой области. Данный выбор связан со стремлением исключить возможность перекрытия сигналов поглощения от изучаемого препарата и от метилметакрилата (жидкого компонента костного цемента). Хотя это маловероятно в силу малой растворимости метилметакрилата в воде и нахождения максимумов его поглощения в областях, близких 190 нм. Для препаратов, в спектрах которых не обнаружено явно выраженных максимумов поглощения, была произвольно выбрана длина волны 268 нм.

Ключевым аспектом как с позиций достоверности получаемых данных, так и принципиальной возможности использования такой формы лекарственного препарата для практического применения являлась оценка устойчивости препаратов в образцах к нагреванию.

Анализ спектров поглощения всех изучаемых препаратов не выявил появления дополнительных областей поглощения после инкубирования при повышенной температуре, что свидетельствовало бы о произошедших изменениях структуры вещества. Получение спектров на примере изониазида представлено на рис. 3.

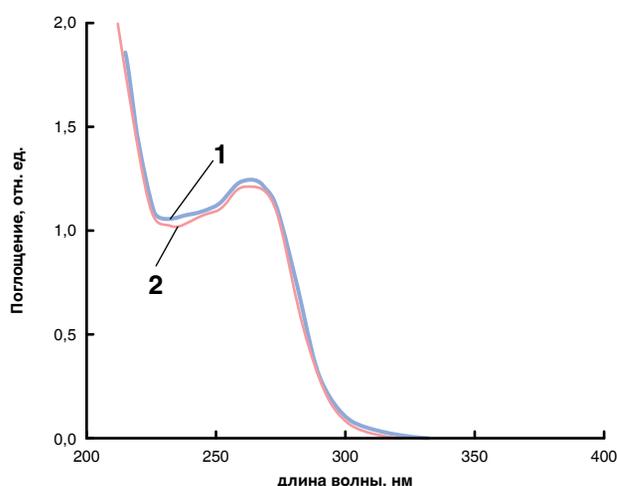


Рис. 3. Спектр экстинкции до (1) и после (2) инкубирования раствора изониазида при повышенной температуре

Fig. 3. Extinction spectrum before (1) and after (2) incubation of isoniazid solution at an elevated temperature

Полученные данные позволяют утверждать, что кратковременный нагрев до 80°C в процессе отверждения костного цемента не привел к значимой деструкции изучаемых препаратов.

При анализе динамики выделения препаратов из образцов отмечено, что все препараты в концентрациях более 5% от массы образца замедляли процесс полимеризации цемента. В силу этого во всех сериях концентрация введенного препарата не превышала 5% от массы образца (0,3 г препарата). Полученные экспериментальные данные, характеризующие динамику элюции каждого препарата в зависимости от времени, приведены на рис. 4 и в табл. 2. Согласно условиям эксперимента, через заданные промежутки времени проводилась полная замена среды вокруг образца, графическая зависимость изменения концентрации препарата в растворе от времени инкубации имела вид ломаной линии (рис. 4). Для упрощения восприятия графической информации для остальных зависимостей «нулевые» точки на график не нанесены.

Результаты исследований концентрации препаратов в растворе, скорость и степень выделения представлены в табл. 2.

Из приведенных данных следует, что для всех образцов большая часть препарата выделялась в течение 1-х сут инкубирования, причем доля выделенного препарата в процентном исчислении снижалась по мере роста количества введенного в образец препарата.

В последующие же дни скорость выделения и количество выделенного препарата снижались. При этом концентрация препарата в растворе на 3-7-е сут (вторая-третья замена среды), достигнув определенного значения (12-30 мкг/мл в зависимости от образца), в дальнейшем оставалась практически неизменной. Существенно, что при этом равновесные концентрации изучаемых препаратов, за

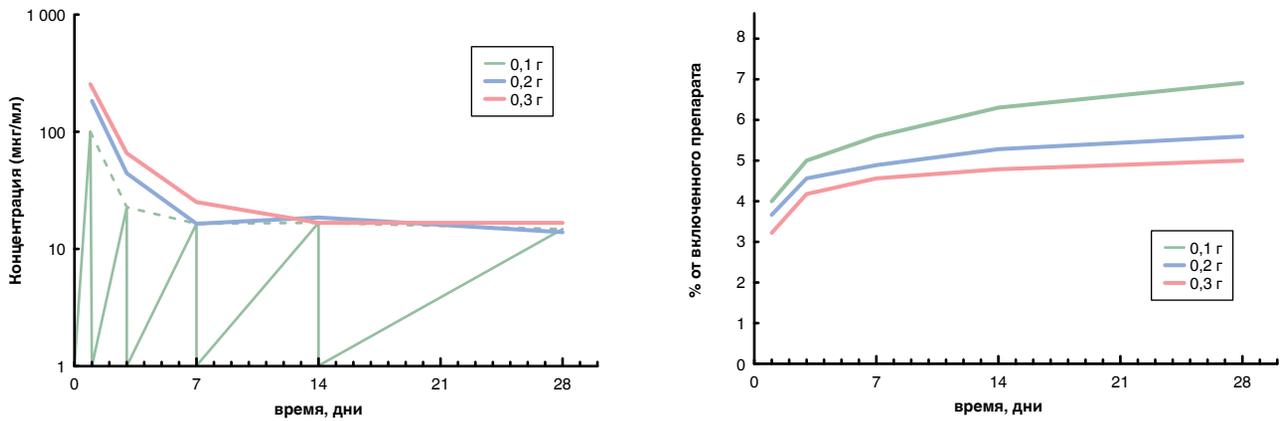


Рис. 4. Изониазид. Концентрация лекарственного препарата в растворе (логарифмическая шкала), доля выделившегося препарата

Fig. 4. Isoniazid. Concentration of the drug in solution (logarithmic scale), the proportion of the drug released

исключением изониазида, были близки или превосходили минимальную ингибирующую концентрацию *in vitro* в отношении *Mycobacterium tuberculosis*. Постоянство концентрации свидетельствует об

установлении равновесия между скоростями сорбции и десорбции препарата. Полученные данные показывают, что доля десорбированного препарата соответствует количеству препарата, содержаще-

Таблица 2. Концентрация препаратов в растворе, скорость и степень их выделения

Table 2. Concentration of drugs in the solution, rate and degree of their release

Сроки (дни)	Концентрация препарата в растворе, мкг/мл			Скорость изменения концентрации в растворе, (мкг/мл)/день			Доля выделившегося препарата, (нарастающий итог) %		
	Количество препарата в образце до эксперимента, г								
	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
Изониазид									
1	102	185	250	102	185	250	4,1	3,7	3,3
3	23	44	67	7,5	14,7	22,3	5,0	4,6	4,2
7	16	17	26	2,3	2,4	3,7	5,6	4,9	4,6
14	17	18	18	1,2	1,3	1,3	6,3	5,3	4,8
28	15	14	17	0,5	0,5	0,6	6,9	5,6	5,0
D-циклосерин									
1	144	254	362	254,0	362,0	144,0	5,8	5,08	4,8
3	27	58,0	89,0	19,3	29,7	8,9	6,8	6,24	6,0
7	24	25,0	26	3,6	3,7	3,4	7,8	6,74	6,4
14	22	21	25	1,5	1,8	1,6	8,7	7,16	6,7
28	25	24	25	0,9	0,9	0,9	9,7	7,64	7,0
Рифампицин									
1	160	282	414	160,0	160,0	414,0	6,4	5,6	5,5
3	32	74	101	10,7	24,7	33,7	7,7	7,1	6,9
7	29	26	32	4,1	3,7	4,6	8,8	7,6	7,3
14	26	22	27	1,9	1,6	1,9	9,9	8,1	7,7
28	29	26	31	1,0	0,9	1,1	11,0	8,6	8,1
Амикацин дисульфат									
1	117	206	330	117	206	330	4,7	4,1	4,4
3	23	54	74	7,8	18,0	24,6	5,6	5,2	5,4
7	21	19	23	3,0	2,7	3,3	6,5	5,6	5,7
14	19	16	20	1,4	1,1	1,4	7,2	5,9	6,0
28	21	19	23	0,8	0,7	0,8	8,1	6,3	6,3
Намаицин сульфат									
1	117	213	287	117	213	287	4,7	4,3	3,8
3	26	51	77	8,7	17,0	25,7	5,7	5,3	4,9
7	17	19	30	2,4	2,7	4,3	6,4	5,7	5,3
14	17	21	21	1,2	1,5	1,5	7,1	6,1	5,5
28	16	17	19	0,6	0,6	0,7	7,7	6,4	5,8
Этамбутол дигидрохлорид									
1	145	264	356	145	264	356	5,8	,3	4,7
3	66	112	170	22,0	37,3	56,7	7,0	7,5	7,0
7	21	23	33	3,0	3,3	4,7	7,9	8,0	7,5
14	20	19	36	1,4	1,4	2,6	8,8	8,4	7,9
28	23	23	29	0,8	0,8	1,0	9,9	8,8	8,3

Заклучение

гося в приповерхностном слое образца костного цемента толщиной всего 0,2-0,4 мм (2-4% радиуса образца), что может свидетельствовать о крайне низкой скорости диффузии препаратов в объеме имплантатов от центра образца к его периферии. При этом подобная картина наблюдается для всех препаратов, несмотря на то что их химическое строение, молекулярная масса и физико-химические характеристики (в первую очередь растворимость в воде) заметно отличаются. На основании этого можно сделать предположение о том, что динамика выделения препарата из образца сшитого костного цемента может определяться гранулометрическим составом порошка используемого препарата в силу того, что мелкие включения водорастворимого препарата будут переходить в раствор заметно быстрее. Удельная поверхность приповерхностного слоя после перехода частиц в раствор и образования микро неоднородностей (микродефектов, полостей, каналов) в случае мелких частиц будет заметно выше [3], что будет вести к адсорбции большего количества перешедшего в раствор препарата и снижению его равновесной концентрации в растворе.

На основании проведенного исследования можно говорить об удовлетворительных показателях термостабильности и элюции изучаемых препаратов при использовании их в смеси с костным цементом.

Использование концентраций препаратов выше 5% приводит к замедлению полимеризации цемента. Не выявлена корреляция между химическим строением, свойствами всех исследуемых препаратов и динамикой их выделения из образцов отвержденного костного цемента. Изучение динамики выделения лекарственного препарата из образца в статических условиях показало сравнительно низкую скорость и полноту выделения в силу достаточно быстрого достижения равновесной концентрации препарата в растворе. Результаты исследования демонстрируют принципиальную возможность создания систем с контролируемым выделением лекарственных препаратов (изониазида, циклосерина, рифампицина, амикацина, канамицина, этамбутола), погруженных в костный цемент.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

- Anagnostakos K., Meyer C. Antibiotic elution from hip and knee acrylic bone cement spacers: a systematic review // *BioMed research international*. – 2017. – Vol. 2017.
- Athans V., Veve M. P., Davis S. L. Trowels and tribulations: review of antimicrobial-impregnated bone cements in prosthetic joint surgery // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. – 2017. – Vol. 37, № 12. – P. 1565-1577.
- Chang C. H., Hu C. C., Chang Y., Hsieh P. H., Shih H. N., Ueng S. W. N. Two-stage revision arthroplasty for *Mycobacterium tuberculosis* periprosthetic joint infection: An outcome analysis // *PLoS one*. – 2018. – Vol. 13, № 9. – P. e0203585.
- Galvez-Lopez R., Pena-Monje A., Antelo-Lorenzo R., Guardia-Olmedo J., Moliz J., Hernandez-Quero J., Parra-Ruiz J. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 78, № 1. – P. 70-74.
- Han C. D., Oh T., Cho S. N., Yang J. H., Park, K. K. Isoniazid could be used for antibiotic-loaded bone cement for musculoskeletal tuberculosis: an in vitro study // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2013. – Vol. 471, № 7. – P. 2400-2406.
- Lee J. H., Han C. D., Cho S. N., Yang I. H., Lee W. S., Baik S. H. How long does antimycobacterial antibiotic-loaded bone cement have in vitro activity for musculoskeletal tuberculosis? // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2017. – Vol. 475, № 11. – P. 2795-2804.
- Lee J. H., Shin S. J., Cho S. N., Baik S. H., Park K. K. Does the effectiveness and mechanical strength of kanamycin-loaded bone cement in musculoskeletal tuberculosis compare to vancomycin-loaded bone cement // *J. Arthroplasty*. – 2020. – Vol. 35, № 3. – P. 864-869.
- Masri B. A., Duncan C. P., Jewesson P., Ngui-Yen J., Smith J. Streptomycin-loaded bone cement in the treatment of tuberculous osteomyelitis: an adjunct to conventional therapy // *Canad. J. Surgery*. – 1995. – Vol. 38, № 1. – P. 64.
- Anagnostakos K., Meyer C. Antibiotic elution from hip and knee acrylic bone cement spacers: a systematic review. *BioMed Research International*, 2017, vol. 2017.
- Athans V., Veve M.P., Davis S.L. Trowels and tribulations: review of antimicrobial-impregnated bone cements in prosthetic joint surgery. *Pharmacotherapy, The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 2017, vol. 37, no. 12, pp. 1565-1577.
- Chang C.H., Hu C.C., Chang Y., Hsieh P.H., Shih H.N., Ueng S.W.N. Two-stage revision arthroplasty for *Mycobacterium tuberculosis* periprosthetic joint infection: An outcome analysis. *PLoS one*, 2018, vol. 13, no. 9, pp. e0203585.
- Galvez-Lopez R., Pena-Monje A., Antelo-Lorenzo R., Guardia-Olmedo J., Moliz J., Hernandez-Quero J., Parra-Ruiz J. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, vol. 78, no. 1, pp. 70-74.
- Han C.D., Oh T., Cho S.N., Yang J.H., Park, K.K. Isoniazid could be used for antibiotic-loaded bone cement for musculoskeletal tuberculosis: an in vitro study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2013, vol. 471, no. 7, pp. 2400-2406.
- Lee J.H., Han C.D., Cho S.N., Yang I.H., Lee W.S., Baik S.H. How long does antimycobacterial antibiotic-loaded bone cement have in vitro activity for musculoskeletal tuberculosis? *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2017, vol. 475, no. 11, pp. 2795-2804.
- Lee J.H., Shin S.J., Cho S.N., Baik S.H., Park K.K. Does the effectiveness and mechanical strength of kanamycin-loaded bone cement in musculoskeletal tuberculosis compare to vancomycin-loaded bone cement. *J. Arthroplasty*, 2020, vol. 35, no. 3, pp. 864-869.
- Masri B.A., Duncan C.P., Jewesson P., Ngui-Yen J., Smith J. Streptomycin-loaded bone cement in the treatment of tuberculous osteomyelitis: an adjunct to conventional therapy. *Canad. J. Surgery*, 1995, vol. 38, no. 1, pp. 64.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, 127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4, кор. 2.

Перецманас Евгений Оркович

руководитель отдела исследований внелегочного туберкулеза.

E-mail: peretsmanas58@mail.ru

Есин Игорь Викторович

старший научный сотрудник отдела исследований внелегочного туберкулеза.

E-mail: yesin.doc@gmail.com

Зубиков Владимир Сергеевич

ведущий научный сотрудник отдела исследований внелегочного туберкулеза.

E-mail: zubikovvladimir@gmail.com

Герасимов Илья Александрович

врач – травматолог-ортопед туберкулезного отделения для больных внелегочным туберкулезом.

E-mail: ilya-1559@rambler.ru

ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева» Минобрнауки РФ, 125047, Москва, Миусская пл., д. 9.
Тел.: + 7 (499) 972-48-08.

Артюхов Александр Анатольевич

профессор кафедры биоматериалов.

E-mail: artyukhov@muctr.ru

Штильман Михаил Исаакович

профессор кафедры биоматериалов.

E-mail: shtilman@yandex.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,
Build. 2, 4, Dostoevskiy St., Moscow, 127473

Evgeniy O. Peretsmanas

Head of Extrapulmonary Tuberculosis Research Department.

E-mail: peretsmanas58@mail.ru

Igor V. Esin

Senior Researcher of Extrapulmonary Tuberculosis Research Department.

E-mail: yesin.doc@gmail.com

Vladimir S. Zubikov

Leading Researcher of Extrapulmonary Tuberculosis Research Department.

E-mail: zubikovvladimir@gmail.com

Ilya A. Gerasimov

Traumatologist and Orthopedist of Extrapulmonary Tuberculosis Unit Department.

E-mail: ilya-1559@rambler.ru

Mendeleev University of Chemical Technology,
9, Miusskaya St., Moscow, 125047.
Phone: +7 (499) 972-48-08.

Aleksandr A. Artyukhov

Professor of Biomaterials Department.

E-mail: artyukhov@muctr.ru

Mikhail I. Shtilman

Professor of Biomaterials Department.

E-mail: shtilman@yandex.ru

Поступила 18.08.2020

Submitted as of 18.08.2020