

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА ТИОЗОНИД

И. В. БОЧАРОВА¹, М. С. БУРЕНКОВ², Л. Н. ЛЕПЕХА¹, Т. Г. СМЕРНОВА¹, Л. Н. ЧЕРНОУСОВА¹, О. В. ДЕМИХОВА¹

PRECLINICAL STUDIES OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF THE NEW ANTITUBERCULOSIS DRUG THIOZONIDE

I. V. BOCHAROVA¹, M. S. BURENKOV², L. N. LEPEKHA¹, T. G. SMIRNOVA¹, L. N. CHERNOUSOVA¹, O. V. DEMIKHOVA¹

¹ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

²ЗАО «Фарм-Синтез», г. Москва

На базе ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН проведено доклиническое исследование *in vitro* и *in vivo* противотуберкулезной активности препарата тиозонид, разработанного ЗАО «Фарм-Синтез» (г. Москва). Исследование *in vitro* показало, что тиозонид обладал антимикобактериальным эффектом, сравнимым с ингибирующим действием изониазида и рифампицина, ингибировал рост культуры вирулентного лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, чувствительного ко всем противотуберкулезным препаратам, культуры штамма *M. tuberculosis* CN-40 с моноустойчивостью к изониазиду и культуры штамма *M. tuberculosis* MS-115 с множественной лекарственной устойчивостью. В результате исследования *in vivo* определено, что продолжительность жизни экспериментальных животных, получавших монотерапию препаратом тиозонид, не отличалась от продолжительности жизни животных, получавших изониазид (INH) и рифампицин (RIF). Совместная терапия тиозонидом с ЭТН и тиозонидом с ПЗА привела к достоверному увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных этих групп по сравнению с монотерапией ПЗА и ЭТН. Показатели КОЕ *Mtb* в легких экспериментальных мышей, принимавших тиозонид, свидетельствовали об эффективном противотуберкулезном эффекте *in vivo* в дозе 25 мг/кг, сравнимом с показателями КОЕ *Mtb* в легких животных, получавших RIF в аналогичной дозе.

Ключевые слова: тиозонид, экспериментальный туберкулез, КОЕ *Mtb*, штаммы *M. tuberculosis*, чувствительный H37Rv, моноустойчивые к INH штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

In vitro and *in vivo* preclinical studies of the antituberculosis activity of thiozonide designed at the ZAO "Farn-Sintez" (Moscow) were conducted at the Central Research of Tuberculosis, Russian Academy of Medical Sciences. The *in vitro* study indicated that thiozonide exerted an antimycobacterial effect that was comparable with the inhibitory activity of isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) suppressed the growth of a cultured virulent laboratory *M. tuberculosis* H37Rv strain that was susceptible to all antituberculosis drugs, a cultured *M. tuberculosis* CN-40 strain that was monoresistant to INH, and a cultured *M. tuberculosis* MS-115 strain that was multidrug resistant. The *in vivo* study established that the survival of the experimental animals receiving thiozonide monotherapy did not differ from that of the animals given INH and RIF. Combined therapy with thiozonide and ethionamide (ETH) and that with thiozonide and pyrazinamide (PZA) versus PZA or ETH monotherapy caused a significant increase in the survival of the experimental animals in these groups. *M. tuberculosis* colony-forming units in the lung of the experimental mice taking thiozonide suggested that the drug administered *in vivo* in a dose of 25 mg/kg produced an effective antituberculous effect that was comparable with those in the lung of the animals receiving RIF in the same dose.

Key word: thiozonide, experimental tuberculosis, *M. tuberculosis* colony-forming units, *M. tuberculosis* strains, susceptible H37Rv, isoniazid-monoresistant *M. tuberculosis* strains, multidrug-resistant *M. tuberculosis* strains.

Актуальной социально значимой проблемой в клинике туберкулеза стало резкое увеличение числа больных туберкулезом, вызванного возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). В 2012 г. доля больных туберкулезом с МЛУ возбудителя среди впервые выявленных составила 16,2%. [1] По данным Всемирной организации здравоохранения, показатели заболеваемости туберкулезом с МЛУ микобактерий туберкулеза (МБТ) достигли наивысшей отметки за всю историю наблюдений, причем они повышаются быстрее, чем это прогнозировалось. Эти формы туберкулеза не поддаются лечению стандартным набором противотуберкулезных препаратов и грозят развитием пандемии устойчивых форм, поэтому поиск и создание новых лекарственных препаратов остаются актуальными направления-

ми для преодоления лекарственной устойчивости и средством повышения эффективности противотуберкулезной терапии.

Цель – исследование *in vitro* и *in vivo* противотуберкулезной активности препарата тиозонид производства фирмы «Фарм-Синтез» (г. Москва).

Задачи исследования:

1. Определение *in vitro* МИК₉₅ тиозонида в отношении трех штаммов *M. tuberculosis*: вирулентного, чувствительного к противотуберкулезным препаратам штамма *M. tuberculosis* H37Rv; штамма *M. tuberculosis* CN-40 с моноустойчивостью к изониазиду и штамма с МЛУ *M. tuberculosis* MS-115.

2. Изучение *in vivo* специфической противотуберкулезной активности препарата тиозонид на летальной модели экссудативно-некротического туберкулеза у мышей.

Материалы и методы

Исследуемый препарат – Тиозонид – {1R,2S + 1S,2R}-1-(6-Бром-2-хлор-хинолин-3-ил)-4-диметиламино-2-(нафталин-1-ил)-1-фенилбутан-2-ол. Эмпирическая формула: C₃₁H₂₈BrClN₂O.

Физико-химические и фармацевтические свойства исследуемого препарата

Препарат представляет собой порошок белого или белого с желтоватым оттенком цвета, нерастворим в воде и изотоническом растворе. По результатам изучения острой токсичности на мышах в двух сериях эксперимента препарат относится к IV классу опасности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. Исследование фармакокинетики тиозонида при однократном пероральном введении на мини-свиньях показало, что тиозонид быстро всасывается в системный кровоток и циркулирует в нем до 48 ч и более.

Штаммы *M. tuberculosis*: вирулентный чувствительный к противотуберкулезным препаратам штамм *M. tuberculosis* H37Rv, штамм *M. tuberculosis* CN-40 с моноустойчивостью к изониазиду и штамм с МЛУ *M. tuberculosis* MS-115. Все использованные в исследовании штаммы хранились в криобирках с жидкой средой Дюбо (Difco) с 20% глицерином при -70°С в коллекции микобактериальных культур ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. Определение бактериостатической активности (ингибирующей рост концентраций) тиозонида *in vitro* оценивали по росту трех штаммов *M. tuberculosis* на агаризованной среде Дюбо ускоренным методом по цветной реакции Грисса на 10-й день после посева и на жидкой питательной среде Дюбо по изменению оптической плотности среды при 600 нм в динамике [5].

Экспериментальные животные

В качестве биологической модели использовали самцов инбредной линии С57BL/6, полученных из питомника вивария ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН, массой 22 г. Мышей инфицировали внутривенным введением *M. tuberculosis* штамма H37Rv из

коллекции института Пастера (Франция) в латеральную хвостовую вену в дозе 5 × 10⁶ КОЕ/мышь (летальная доза). Экспериментальных животных разделили на группы, представленные в табл. 1 [4]. В течение всего эксперимента животные содержались в стандартных условиях согласно санитарным требованиям РФ. [3] Препараты вводили внутривенно ежедневно, кроме выходных, в течение 2 мес., через 2 нед. после заражения. INH, RIF, PZN и ETH растворяли в воде, а тиозонид растворяли в воде с добавлением 0,05% Tween-80. Объем вводимого препарата составлял 0,5 мл/мышь. Для микробиологических и морфологических исследований животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Оценку противотуберкулезной активности тиозонида выполняли с использованием показателей продолжительности жизни экспериментальных животных после инфицирования, количества КОЕ МБТ в легком мышей и гистологического исследования легкого, селезенки и печени экспериментальных животных через 2 мес. после начала лечения [2]. В связи с тем, что для успешной терапии туберкулеза с лекарственной чувствительностью возбудителя используются одновременно 4 противотуберкулезных препарата, данное исследование решили дополнить изучением взаимодействия препарата тиозонид с противотуберкулезными препаратами 1-го ряда – INH, RIF, ETH и PZN.

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения «Биостатистика» и MS Office Excel. Оценивали среднее значение (*M*), ошибку среднего (*SEM*), статистическую значимость (*p*) при 95%-ном доверительном интервале.

Результаты исследования *in vitro*

Исследования антимикобактериальной активности тиозонида показали, что препарат обладал значительной подавляющей рост активностью в отношении используемых штаммов *M. tuberculosis*. Данные о влиянии тиозонида и контрольных препа-

Таблица 1

Группы экспериментальных животных

№	Инфицирование	Терапевтический препарат	Доза препарата мг/кг	Число животных в группе
1	<i>Mtb</i> H37Rv	без лечения – отрицательный контроль		10
2	<i>Mtb</i> H37Rv	тиозонид (Т)	25	15
3	<i>Mtb</i> H37Rv	изониазид (INH)	25	15
4	<i>Mtb</i> H37Rv	рифампицин (RIF)	25	15
5	<i>Mtb</i> H37Rv	этамбутол (ETH)	25	15
6	<i>Mtb</i> H37Rv	пиразинамид (PZA)	25	15
7	<i>Mtb</i> H37Rv	тиозонид + изониазид (Т + INH)	25 + 25	15
8	<i>Mtb</i> H37Rv	тиозонид + рифампицин (Т + RIF)	25 + 25	15
9	<i>Mtb</i> H37Rv	тиозонид + этамбутол (Т + ETH)	25 + 25	15
10	<i>Mtb</i> H37Rv	тиозонид + пиразинамид (Т + PZA)	25 + 25	15
11	ннт активные	Tween-80	0,05%	5

ратов на рост культур *M. tuberculosis* представлены в табл. 2. При тестировании по нитрат-редуктазной активности его МИК₉₅ для всех исследованных штаммов была < 0,19 мкг/мл, а при тестировании по оптической плотности (ОП) МИК₉₅ составляла 3,125-12,500 мкг/мл в зависимости от штамма. Тот факт, что МИК₉₅ для тиозонида, определенная с помощью нитрат-редуктазного теста, была меньше МИК₉₅, выявленной по ОП, не является определяющим, поскольку при сравнительном анализе учитывались данные 95%-ного ингибирования роста культуры на жидкой среде Дюбо на 19-й день, а на плотной среде результаты были получены на 10-й день исследования без учета процента ингибирования. Поскольку к активным препаратам относятся соединения, вызывающие 95%-ное ингибирование роста микобактерий, тиозонид можно отнести к субстанциям, имеющим большую

перспективу. Особую важность имеют результаты, демонстрирующие высокую активность тиозонида в отношении лекарственно-устойчивых штаммов *Mtb*. Несмотря на то что при исследовании динамики роста культур на жидкой среде Дюбо прослеживали тенденцию увеличения МИК₉₅ препарата в зависимости от спектра ЛУ-штамма для тиозонида, его действующие концентрации в отношении ЛУ-штаммов оставались достаточно низкими (6,25-12,50 мкг/мл). Результаты, полученные при тестировании по нитрат-редуктазной реакции на плотной среде, показали, что МИК₉₅ тиозонида были одинаково низкими (< 0,19 мкг/мл) как для чувствительного, так и для устойчивых штаммов, то есть не зависели от спектра лекарственной чувствительности, что еще раз подчеркивает перспективность тиозонида для воздействия на МЛУ-штаммы *Mtb*.

Таблица 2

Показатели МИК₉₅ тиозонида при воздействии на рост культур *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде Дюбо по изменению оптической плотности среды при 600 нм на 19-й день эксперимента

Препарат	Концентрация	% ингибации роста культуры			МИК ₉₅ * (мкг/мл)		
		Rv	CN-40	MS-115	Rv	CN-40	MS-115
T	12,5-50,0 мкг/мл	≥ 95	≥ 95	≥ 95	3,125	6,25	12,5
	6,25 мкг/мл	≥ 95	≥ 95	94			
	3,125 мкг/мл	≥ 95	93	92			
	1,56 мкг/мл	65	65	88			
	0,78 мкг/мл	61	65	58			
	0,39 мкг/мл	53	64	–			
	0,05-0,20 мкг/мл	22-33	27-30	–			
RIF	12,5-50,0 мкг/мл	≥ 95	≥ 95	5-14	< 0,05	< 0,05	> 50
	0,05-6,25 мкг/мл	≥ 95	≥ 95	–			
INH	12,5-50,0 мкг/мл	≥ 95	≥ 95	64-86	< 0,05	6,25	> 50
	6,25	≥ 95	≥ 95	–			
	3,125 мкг/мл	≥ 95	75	–			
		≥ 95	–	–			

Примечание: * – минимальная концентрация препарата, ингибирующая рост культуры более чем на 95%.

Результаты исследования *in vivo*

У мышей контрольной группы, не получавших противотуберкулезных препаратов, выживаемость после смертельной дозы заражения составила $25,0 \pm 0,57$ дня. Мыши, получавшие тиозонид в дозе 25 мг/кг, так же как и мыши, получавшие INH и RIF в аналогичной дозе, прожили свыше 120 дней; получавшие лечение PZA – $84,1 \pm 0,27$ дня, а ETH – $94,30 \pm 0,12$ дня. При совместном введении тиозонида и противотуберкулезных препаратов 1-го ряда во всех группах наблюдали увеличение продолжительности жизни экспериментальных животных. Полученные данные представлены на рис. 1. Микробиологическое исследование легких экспериментальных животных показало, что минимальное количество КОЕ *Mtb* при монотерапии противотуберкулезными препаратами в группе животных, получавших INH, составило $(1,77 \pm 0,13) \times 10^5$. Количество *Mtb* в легких животных, полу-

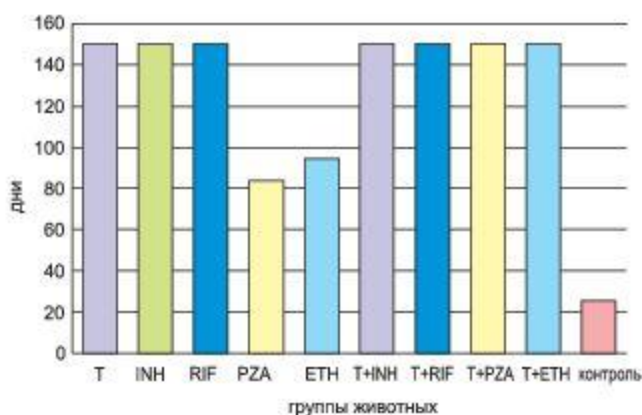


Рис. 1. Продолжительность жизни мышей линии C57BL/6 после внутривенного инфицирования *M. tuberculosis* штамма H37Rv в дозе 5×10^6 КОЕ/мышь, через 2 мес. после начала лечения противотуберкулезными препаратами 1-го ряда в дозе 25 мг/кг

чавших монотерапию тиозонидом и RIF, было приблизительно одинаковым – $(7,7 \pm 1,1) \times 10^6$ и $(8,3 \pm 1,5) \times 10^6$ соответственно ($p \leq 0,05$), но ниже, чем в группе, получавшей ETH – $(1,1 \pm 0,1) \times 10^7$, и на порядок ниже, чем в группе, получавшей PZA – $(6,5 \pm 2,5) \times 10^7$. При совместном введении тиозонида и противотуберкулезных препаратов отмечено значительное снижение КОЕ *Mtb* в группах, получавших тиозонид вместе с INH и RIF. Снижение количества КОЕ *Mtb* почти в 10 раз по сравнению с монотерапией PZA отмечено в группе, получавшей тиозонид вместе с PZA – $(9,8 \pm 1,7) \times 10^6$ ($p \leq 0,05$), и в 2 раза – в группе, получавшей тиозонид и ETH – $(5,5 \pm 1,6) \times 10^6$, по сравнению с монотерапией ETH ($p \geq 0,05$) (рис. 2). Таким образом, тиозонид *in vivo* проявлял противотуберкулезную активность в легких мышей, сравнимую с противотуберкулезной активностью RIF, существенно увеличивая ее при совместном введении с препаратами 1-го ряда – INH, RIF, PZA ($p < 0,05$), но незначительно при взаимодействии с ETH ($p > 0,05$), что свидетельствует о синергизме действия тиозонида и противотуберкулезных препаратов 1-го ряда.

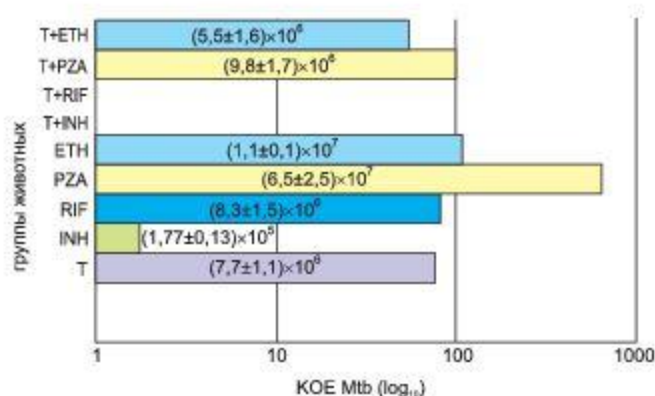


Рис. 2. Количество КОЕ *Mtb* штамма H37Rv/легкое мыши через 2 мес. после начала лечения. В группах (T + INH) и (T + RIF) (разведение 1 : 1 000) КОЕ *Mtb* не обнаружено

Результаты гистологического исследования тиозонида

Острая модель туберкулеза у экспериментальных мышей характеризуется развитием экссудативно-некротического воспалительного процесса, поражающего различные паренхиматозные органы. Обычно животные контрольной группы погибают от генерализованного туберкулеза через 22-32 дня в зависимости от инбредной линии мышей, используемой в эксперименте. В терминальной стадии процесса в легких, печени и селезенке наблюдается сладж эритроцитов, в кровеносных сосудах крупного и среднего калибра выявляются юные и зрелые формы полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ). Среди альвеолярных макрофагов преобладают липофаги с пенистой цитоплазмой. Именно в этих клетках определяются скопления

Mtb. Поэтому наличие пенистых клеток (ПК), особенно разрушенных их форм, отражает активность специфического воспаления у мышей, не получающих противотуберкулезных препаратов.

В легких мышей, получавших 2 мес. тиозонид, наблюдали картину крупноочагового туберкулезного процесса. Однако в составе инфильтратов преобладали моноциты и лимфоциты, формирующие самостоятельные скопления (лимфонодулы), которые у контрольных животных выявлялись относительно редко. Наиболее выраженный терапевтический эффект гистологически отмечен в группе мышей при совместной терапии тиозонидом и INH. Практически вся легочная ткань (не менее 95%) сохраняла воздушность, тогда как у мышей, получавших монотерапию INH, она составляла 75-80%. В печени и селезенке животных, получавших комплексную терапию, структура этих органов восстанавливалась практически полностью. У животных этой группы каких-либо признаков туберкулезного воспаления не выявлено. У животных, получавших тиозонид в сочетании с RIF, также отмечен хороший терапевтический эффект, более выраженный, чем в группе сравнения (RIF). Воздушная легочная ткань у этих животных составляла 85-90 и 75-80% соответственно. Близкое состояние паренхиматозных органов отмечено у животных, получавших тиозонид в сочетании с ETH. Вместе с тем у мышей этой группы воздушность легочной ткани составляла не более 55%, в паренхиме сохранялись выраженные клеточные инфильтраты со скоплениями в них ПК и ПЯЛ. Аналогичные изменения паренхиматозных органов наблюдали в группе сравнения, получавшей ETH. Наименее выраженный терапевтический эффект отмечен у мышей, получавших тиозонид в сочетании с PZA. Как и в группе сравнения (PZA), в легких этих животных обнаружены признаки активного туберкулезного процесса, крупные скопления ПК и ПЯЛ. Воздушная легочная паренхима в обеих группах составляла не более 35%. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что, по сравнению с контрольными животными, введение инфицированным мышам тиозонида в течение 2 мес. активизирует приток в легкие и другие паренхиматозные органы моноцитов и лимфоцитов, что задерживает развитие активного туберкулезного воспаления. Препарат тиозонид повышает терапевтическую активность большинства противотуберкулезных препаратов 1-го ряда, что особенно характерно для INH и RIF, и несколько меньше – для ETH и PZA.

Выводы

1. В исследовании *in vitro* тиозонид имел выраженную антимикобактериальную активность и ингибировал рост культуры вирулентного лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, культуры штамма *M. tuberculosis* CN-40 с моноустойчивостью

к INH и культуры штамма *M. tuberculosis* MS-115 с МЛУ.

2. Продолжительность жизни животных на летальной модели туберкулеза, получавших монотерапию препаратом тиозонидом, была аналогичной для животных, получавших монотерапию INH или RIF.

3. Установлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение продолжительности жизни экспериментальных мышей на летальной модели туберкулеза у мышей, получавших препарат тиозонид по сравнению с животными контрольной группы и с животными, получавшими монотерапию PZA и EТН.

4. Установлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение продолжительности жизни животных, получавших совместную терапию препаратом тиозонидом и противотуберкулезными препаратами 1-го ряда PZA и EТН по сравнению с монотерапией PZA и EТН.

5. Установлено бактериостатическое действие препарата тиозонида в дозе 25 мг/кг *in vivo* на *M. tuberculosis* H37Rv, сравнимое ($p > 0,05$) с бактериостатическим действием RIF в аналогичной дозе и на порядок превышающее действие PZA и EТН в дозах 25 мг/кг ($p < 0,05$).

6. Совместное введение тиозонида с INH, RIF, PZA и EТН усиливало противотуберкулезное действие препаратов в отношении чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, что подтверждено микробиологически и гистологически.

Представленный новый противотуберкулезный препарат тиозонид обладает выраженной противотуберкулезной активностью как в отношении чувствительного штамма *M. tuberculosis* H37Rv, так и в отношении штаммов *Mtb*, устойчивых к изониазиду, а также обладающих МЛУ, обладает синергиз-

мом с противотуберкулезными препаратами 1-го ряда, что доказано бактериологически и гистологически. Учитывая данные о противотуберкулезной активности препарата, низкую токсичность тиозонида, что немаловажно при длительной терапии туберкулеза, быстрое всасывание и длительную циркуляцию в крови, можно заключить, что тиозонид является перспективным препаратом для дальнейших клинических исследований у больных туберкулезом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данные ЦНИИОИЗ МЗ РФ за 2012 г.
2. Ерохин В. В., Мартьянова Л. П., Бочарова И. В. и др. Доклиническое исследование нового комплексного противотуберкулезного препарата фтиозонин цинк // Туб. – 2011. – № 12.
3. Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики».
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – Ч. 1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 568.
5. Черноусова Л. Н., Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н. и др. Уровень цитокинов при инфицировании *ex vivo* макрофагов мыши микобактериями туберкулезного комплекса // Туб. – 2009. – Т. 86, № 8. – С. 46-48.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Бочарова Ирина Владимировна

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,
старший научный сотрудник отдела иммунологии, за-
ведующая виварием.

107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, д. 2.

Тел.: 8 (499) 780-47-14.

E-mail: 3595598@mail.ru

Поступила 26.11.2013