

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

*Остр.*

**Островский Константин Петрович**

**РАЗРАБОТКА ВОДОСОВМЕСТИМЫХ ФОРМ АНТИБИОТИКОВ  
РИФАМИЦИНОВОГО РЯДА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
СВОЙСТВ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор химических наук,

Гельперина С.Э.

Доктор биологических наук,

Переверзева Э.Р.

Москва – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы .....	11
1.1 Туберкулез: краткая историческая справка и современное состояние проблемы .....	12
1.2 Биологические аспекты и патогенез туберкулеза .....	15
1.3 Основные противотуберкулезные препараты .....	17
1.4 Разработка инновационных форм противотуберкулезных препаратов .....	23
Глава 2. Материалы и методы .....	36
2.1 Оборудование и реактивы .....	36
2.2 Построение калибровочной зависимости для количественного определения рифапентина и рифаксимиона .....	37
2.3 Определение растворимости рифапентина и рифаксимиона .....	37
2.4 Получение водосовместимой формы рифапентина .....	39
2.4.1 Метод наноосаждения .....	39
2.4.2 Гомогенизация с помощью высокоскоростного диспергатора .....	40
2.4.3 Гомогенизация высокого давления .....	40
2.4.4 Метод ультразвуковой гомогенизации .....	40
2.5 Получение водосовместимой формы рифаксимиона .....	41
2.6 Определение физико-химических параметров полученных образцов .....	41
2.6.1 Определение общего содержания рифапентина и рифаксимиона .....	41
2.6.2 Определение содержания рифапентина и рифаксимиона в водной фазе .....	42
2.6.3 Определение размеров частиц .....	42
2.6.4 Определение белка в образцах .....	44
2.6.5 Оценка чистоты рифапентина методом ВЭЖХ .....	45
2.7 Оценка воспроизводимости технологии .....	46
2.8 Принцип построения эксперимента и статистической обработки данных .....	47
2.9 Оценка параметров связывания антибиотиков с белками методом тушения флуоресценции .....	50
2.10 Экспериментальное изучение эффективности водосовместимой формы рифапентина .....	52
2.10.1 Получение экспериментального препарата .....	52
2.10.2 Моделирование туберкулезной инфекции у мышей .....	53
2.10.3 Лечение животных .....	53
2.10.4 Оценка результатов лечения .....	54
2.10.5 Обработка экспериментальных данных .....	54

2.11 Токсикологическое исследование водосовместимой формы рифапентина	55
2.11.1 Получение экспериментального препарата	55
2.11.2 Изучение острой токсичности	55
2.11.3 Изучение хронической токсичности	56
Глава 3. Результаты и обсуждение	60
3.1 Разработка методов количественного определения рифапентина и рифаксимины в водосовместимых лекарственных формах	60
3.2 Определение растворимости рифапентина и рифаксимины	63
3.3 Получение водосовместимой формы рифапентина и рифаксимины	68
3.3.1 Водосовместимая форма рифапентина	71
3.3.2 Водосовместимая форма рифаксимины	85
3.3.3 Статистическая оценка результатов	90
3.3.4 Влияние условий заморозки на характеристики водосовместимой формы рифапентина	95
3.3.5 Масштабирование эксперимента по получению водосовместимой формы рифапентина	99
3.4 Изучение связывания антибиотиков с белками	101
3.5 Изучение эффективности водосовместимой формы рифапентина	109
3.6 Токсикологическое исследование водосовместимой формы рифапентина	113
3.6.1 Острая токсичность	113
3.6.2 Хроническая токсичность	115
Заключение	132
Выводы	133
Обозначения и сокращения	134
Список литературы	136
Список иллюстративного материала	148
Приложение А. Результаты патоморфологического исследования внутренних органов крыс	152

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Туберкулез – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний. Для его более эффективного лечения необходимы инновационные разработки, которые включают не только поиск новых молекулярных мишеней и более активных субстанций, но и оптимизацию уже имеющихся препаратов.

Так, рифапентин, антибиотик рифамицинового ряда, обладает высокой бактерицидной активностью в отношении микобактерий, локализованных как внутри, так и вне эукариотических клеток. Рифапентин является эффективным средством для лечения туберкулеза; в частности, он обладает преимуществом перед рифампицином (препаратом I ряда для лечения лекарственно-чувствительных форм туберкулеза), что обусловлено его более высокой ингибирующей активностью в отношении *M. tuberculosis* и более длительным периодом полувыведения.

В связи с низкой растворимостью рифапентина в воде (менее 1 мг/мл) этот антибиотик выпускается только в форме таблеток и капсул. В то же время, разработка инъекционной формы рифапентина позволила бы расширить область его использования, обеспечив возможность применения у пациентов с сопутствующими острыми заболеваниями желудочно-кишечного тракта, а также в случаях плохой переносимости или трудностей при приеме внутрь.

С этой точки зрения, интерес представляет также другой труднорастворимый антибиотик рифамицинового ряда: рифаксимин, – который, обладая широким спектром действия в отношении многих грамотрицательных и грамположительных бактерий, применяется только для лечения инфекций желудочно-кишечного тракта, что обусловлено его крайне низкой биодоступностью.

Таким образом, разработка метода повышения растворимости рифапентина и рифаксимины в водных средах, обеспечивающего возможность получения внутривенных лекарственных форм, является важной задачей.

В целом, разработка инъекционных форм труднорастворимых субстанций является одной из наиболее актуальных и сложных проблем фармацевтической технологии. Для решения этой проблемы применяются разнообразные подходы, например, введение соразтворителей, получение твердых дисперсий, технология нанокристаллов. Особые перспективы создает разработанная в рамках настоящего исследования технология солюбилизации труднорастворимых соединений с использованием природных высокомолекулярных поверхностно-активных веществ (ПАВ), в частности, белков. Это позволяет избежать побочных эффектов, вызванных синтетическими ПАВ, и обеспечить длительную устойчивость коллоидных систем.

Разработанная технология получения водосовместимых форм может быть применена также для антибиотиков других классов и прочих лекарственных веществ, имеющих низкую растворимость в воде. Под термином «водосовместимость», применяемым в данной работе, следует понимать свойство композиций образовывать истинные растворы или коллоидные системы в водных средах [1, 2].

**Цель и задачи исследования.** *Цель* исследования состояла в разработке водосовместимых форм рифамициновых антибиотиков на примере рифапентина и рифаксимины, пригодных для внутривенного введения, и оценке специфической активности и токсического действия водосовместимой формы рифапентина.

Для достижения поставленной цели в процессе исследования решались следующие *экспериментальные задачи*:

- разработать методы получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины;
- оценить воспроизводимость технологических условий получения разрабатываемых лекарственных форм;
- исследовать взаимодействие между белками и антибиотиками, используемыми в работе;

- изучить эффективность внутривенной формы рифапентина на модели острого экспериментального туберкулеза у мышей;
- изучить острую и хроническую токсичность внутривенной формы рифапентина.

**Научная новизна.** Впервые разработаны водосовместимые коллоидные формы малорастворимых в воде антибиотиков рифапентина и рифаксимины. Впервые изучены закономерности процесса получения водосовместимых формы этих антибиотиков на основе различных белков.

Впервые изучено взаимодействие указанных антибиотиков с человеческим сывороточным альбумином, сукцинированным желатином и казеинатом натрия. Показано, что, несмотря на связывание с белком, рифапентин не утрачивал своей противомикробной активности, что характерно для многих антибиотиков. Показано, что роль белка заключается преимущественно в стабилизации суспензии наночастиц субстанции, образующихся в технологическом процессе.

Впервые изучена острая и хроническая токсичность водосовместимой формы рифапентина. Показано, что разработанная внутривенная форма рифапентина отличается отсутствием гастроинтестинальной токсичности и меньшей кардиотоксичностью по сравнению с перорально введенной субстанцией.

**Практическая значимость.** Разработаны водосовместимые лекарственные формы рифапентина и рифаксимины, пригодные для внутривенного введения, что обеспечивает альтернативный путь введения антибиотиков в случае невозможности перорального приема. Внутривенный путь введения антибиотиков позволит устранить недостатки, характерные для перорального введения, например, длительное всасывание из желудочно-кишечного тракта, влияние состава употребляемой пищи на всасывание.

Полученные результаты предполагают, что данный технологический подход может быть пригоден для разработки водосовместимых форм лекарственных веществ других классов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- разработан метод получения водосовместимых лекарственных форм рифапентина и рифаксимины;
- разработанные формы представляют собой устойчивые суспензии антибиотиков, стабилизированные белками с общим содержанием антибиотиков в водной фазе 10,23 и 3,26 мг/мл, что превышает их растворимость в воде в 94 и 1203 раза, соответственно;
- оптимальным солюбилизатором для рифапентина из рассмотренных является человеческий сывороточный альбумин, для рифаксимины – казеинат натрия;
- полученная внутривенная водосовместимая форма рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина эффективна в отношении острого экспериментального туберкулеза у мышей;
- острая и субхроническая токсичность полученной внутривенной формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина не превышает токсичности субстанции, введенной перорально, при этом внутривенная форма отличается пониженной кардиотоксичностью и отсутствием гастроинтестинальной токсичности.

**Личный вклад автора.** На основании анализа научной литературы автором выбраны подходы к разработке водосовместимых форм рифамициновых антибиотиков рифапентина и рифаксимины. Автор самостоятельно провел исследования по определению растворимости антибиотиков в воде, водных растворах белков и других вспомогательных веществ. С целью выбора технологии получения водосовместимых форм автором также были проведены сравнительные исследования различных методов (осаждение и гомогенизация)

получения суспензий, а также осуществлен выбор наиболее эффективного стабилизатора. Автором самостоятельно наработаны экспериментальные партии водосовместимой формы рифапентина для изучения биологических свойств. Токсикологические исследования были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н. Переверзевой Элеоноры Рафаиловны. Личный вклад автора в выполнении исследования составляет более 80%.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность проведенных исследований подтверждается результатами статистической обработки всех экспериментальных данных, публикацией результатов работы в научных изданиях из списка ВАК, а также апробацией работы на международных и всероссийских конференциях.

Основные положения работы были представлены на: Конференции по разработке, исследованию и маркетингу фармацевтической продукции (Пятигорск, 2014); XXI Конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014; был награжден дипломом за лучший доклад); Международной фармацевтической конференции (Лиссабон, 2014); Научно-практической Конференции молодых ученых (Москва, 2017), Международной Конференции по фармацевтике и системам доставки лекарственных средств (Валенсия, 2017).

Результаты диссертационной работы докладывались на заседании Ученого Совета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» и на заседании экспертного совета Общества с ограниченной ответственностью «Технология лекарств» (2018).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации результатов диссертационных работ.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 162 страницах, содержат 53 таблицы и 24 рисунка. Список литературы включает 184 источника, в том числе 145 на иностранном языке.

**Место проведения работы.** Работа выполнена в Лаборатории систем доставки Общества с ограниченной ответственностью «Технология лекарств» и Лаборатории фармакологии и химиотерапии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе».

Для проведения испытания противотуберкулезной активности партия препарата была передана в Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболенск), работа была выполнена д.б.н. Потаповым В.Д. и сотрудниками его подразделения при участии автора.

Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям д.б.н. Переверзевой Элеоноре Рафаиловне и д.х.н. Гельпериной Светлане Эммануиловне за неоценимую помощь, ценные советы и всестороннюю поддержку при выполнении работы.

Автор выражает благодарность Обществу с ограниченной ответственностью «Наносистема» за опыт, полученный в ходе работы в этой организации (2011-2015), и за финансирование исследования эффективности водосовместимой формы рифапентина.

Глубокую признательность и благодарность автор выражает Государственному научному центру прикладной микробиологии и биотехнологии, его сотруднику д.б.н. В.Д. Потапову и соисполнителям за проведение испытания противотуберкулезной активности внутривенной формы рифапентина, критические замечания и ценные консультации, оказавшие помощь в написании научной статьи по данной теме.

Автор выражает искреннюю благодарность коллегам за помощь, поддержку, дискуссии и ценные советы при выполнении отдельных разделов экспериментальной части работы: Н.С. Осиповой, Е.В. Шипуло, Л.В. Ванчуговой, О.О. Максименко; а также А.П. Будько за обучение основам метода ВЭЖХ и разработку методики хроматографического определения рифапентина. Автор выражает благодарность заведующему Лабораторией фармакологии и химиотерапии НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, И.Д. Трещалину, и сотрудникам Лаборатории за предоставленную возможность проведения токсикологического исследования, переданные знания и поддержку в работе.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Несмотря на значительные успехи в разработке противомикробных средств, многие инфекционные заболевания, в особенности, вызванные внутриклеточными инфекционными агентами, все еще трудно поддаются лечению. Одна из основных причин заключается в том, что многие антибиотики плохо проникают через клеточные мембраны и обладают низкой активностью внутри клеток, а значит, их действие на внутриклеточные бактерии оказывается недостаточно эффективным. Кроме того, недостаточная селективность действия антибиотиков приводит к выраженным побочным эффектам, накладывающим ограничение на их применение. Например, аминогликозиды оказывают ототоксическое и нефротоксическое действие, и должны приниматься в контролируемых дозах. Другая значимая проблема при использовании противомикробных средств связана с приобретенной устойчивостью к ним инфекционных микроорганизмов. Для решения этих проблем были предложены альтернативные стратегии доставки противомикробных средств. Вместе с тем, даже при отсутствии резистентности и необходимости бороться с внутриклеточными патогенами, антибиотик может не проявлять своей эффективности в полной мере из-за недостатков, обусловленных его физико-химическими и фармакокинетическими свойствами. Так, многие лекарственные субстанции малорастворимы в воде, что ограничивает их применение преимущественно пероральными формами. Низкая пероральная биодоступность в сочетании с низкой растворимостью в воде (как, например, у рифабутина, антибиотика рифамицинового ряда) требует приема больших доз препарата – а в противном случае может благоприятствовать развитию резистентности.

В данном обзоре рассмотрены основные достижения и трудности создания растворимых и водосовместимых форм, а также наноразмерных систем доставки различных противомикробных средств и приведены примеры успешного применения этой технологии. Основное внимание уделено исследованиям в области создания инновационных лекарственных форм для лечения туберкулеза.

## **1.1 Туберкулез: краткая историческая справка и современное состояние проблемы**

Человек сталкивался с туберкулезом (ТБ) с древних времен. Именно из древнегреческого языка пришло слово «фтизис», которым называли это заболевание. Оно же стало основой термина «фтизиатрия» – наука о туберкулезе. Другое слово, «туберкулум» (на латыни оно означает «бугорок»), собственно, и дало такое название болезни (предложенное Я. Сильвиусом), какое мы сейчас знаем [3, 4].

О характерных признаках заболевания можно судить по археологическим раскопкам (Бартельс, Леманн, Моллиссон): так, следы характерного поражения наблюдались в древнеегипетских мумиях и скелетах древних людей, больных ТБ позвоночника. Сведения об этом заболевании и предлагаемых способах его лечения содержатся в древних индийских и китайских текстах [5, 6]. В летописях есть свидетельства о случаях массового заболевания ТБ на Руси [3].

Очевидно, что эффективное лечение заболевания не представлялось возможным до установления его истинной причины. Интересно, что об инфекционной природе этого заболевания догадывались задолго до становления микробиологии, хотя некоторые врачи (например, Гиппократ), считали заболевание наследственным [7]. Возбудитель ТБ был выделен Р. Кохом в 1882 г. и дата его открытия (24 марта) была позже объявлена Всемирным днем борьбы с туберкулезом. Главными причинами распространения открытого им возбудителя Р. Кох считал социальные и физиологические факторы: ослабленный организм и неблагоприятные жизненные условия. Неудивительно, что голод и безработица, экономические кризисы, войны совпадали по времени со стремительным распространением ТБ [8].

Тем не менее, до начала эры антибиотиков отсутствовали эффективные средства для борьбы с ТБ. Основные меры были направлены на общее укрепление организма пациента, его иммунной системы, для чего создавались туберкулезные санатории. По статистике десятая часть пациентов таким образом излечивалась полностью [9]. В то же время развивались хирургические методы лечения ТБ:

пневмоторакс, пневмолиз, торакопластика, дренаж каверн [3, 10]. С другой стороны, были попытки применения различных соединений природного и синтетического происхождения, которые можно считать первыми химиотерапевтическими средствами для лечения ТБ. Так, были описаны ингаляции порошка бензоата натрия, ингаляции или прием внутрь букового креозота, инъекции разбавленных растворов формальдегида [11-13]. Первым противотуберкулезным антибиотиком был стрептомицин из класса аминогликозидов, выделенный З. Ваксманом и А. Шацем в 1943 г. [14]. Затем в 1950-е годы в лаборатории Лемана было получено синтетическое средство: пара-аминосалициловая кислота [15]. Следом за этим были получены тибон, изониазид, этамбутол и другие противотуберкулезные средства. В 1960-е годы были открыты рифамициновые антибиотики – основа современной противотуберкулезной терапии. Открытие принадлежит микробиологу Пинхасу Маргалиту и сотрудникам компании «Груп Лепетит Спа» Пьеро Сенси и Марии Терезе Тимбаль, в лабораториях которой в Милане была выделена природная молекула. Большой вклад в развитие рифамицинов внесли Ренато Крикио и Витторио Ариоли – сотрудники той же компании, занимавшиеся химическими модификациями исходной молекулы [16, 17].

Повышение уровня жизни и появление антибиотиков улучшило ситуацию. Однако распространение ВИЧ/СПИД и развитие устойчивости возбудителя к антибиотикам создало дополнительные сложности, требуя принципиально новых подходов. Л.Б. Хейфец, один из ведущих мировых специалистов в данной области, пишет о «втором пришествии» «белой чумы», отмечая, что новые неизлечимые формы ТБ – это вызов для современной медицины [18]. В 1993 г. Всемирная Организация Здравоохранения объявила ТБ глобальной проблемой.

Согласно последним данным ВОЗ, в прошедшем году 1,3 млн человек умерли от ТБ, из которых 335 тыс. больных ВИЧ/СПИД, а число вновь заболевших составило 10 млн человек, из которых более 500 тыс. приходится на туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью [19]. Последнее особенно характерно для эндемичных зон, в частности, Индии [20], где, несмотря

на развитую фармацевтическую промышленность, остро не хватает препаратов от такой формы ТБ. В России заболеваемость ТБ возросла в 2,7 раза за 1980-1990 гг. и достигла некоторых стабильных значений, наблюдающихся в настоящий момент (около 80 на 100 тыс. человек) [21]. Беспокорство вызывает и Восточная Европа, где возрастает доля резистентных форм [22].

Хотя в целом за последнюю четверть XX века интенсивность ТБ стала снижаться, а уровень диагностики и лечения улучшается, этого оказывается недостаточно. Тем более, учитывая, что в планах ВОЗ было сократить уже к 2015 г. заболеваемость в 2 раза по сравнению с 1990 г. и к 2050 г. устранить ТБ как глобальную проблему (менее 1 случая на 1 млн человек в год) [23, 24]. Кроме того, пропуск записей о наблюдении за пациентами означает, что происходит занижение показателей по заболеваемости и завышение показателей по эффективности лечения [25].

Вместе с тем, такие профилактические меры, как вакцинация недостаточны, так как применяемая в настоящее время вакцина БЦЖ (*M. bovis* BCG) оказывается малоэффективной, особенно для профилактики наиболее распространенного легочного ТБ [26]. Ее действие существенно определяется конкретной популяцией: имеет значение место проживания, возраст, время вакцинации и туберкулиновая чувствительность [27]. Большие надежды подает инновационная вакцина H56, разработанная в лаборатории П. Андерсена, которая эффективна даже на поздних стадиях инфекции и способна усиливать эффект БЦЖ. Однако пока что она не дошла до практического применения [28].

По этим причинам основной мерой по борьбе с туберкулезом остается антибиотикотерапия. Поскольку после внедрения рифамицинов фактически не были введены в клиническую практику новые субстанции, крайне актуальной задачей становится разработка инновационных лекарственных форм существующих антибиотиков, обеспечивающих их направленную доставку или расширяющих область применения за счет возможности альтернативных способов введения.

## 1.2 Биологические аспекты и патогенез туберкулеза

Возбудителем туберкулеза являются микобактерии, произошедшие, как предполагают, от почвенных бактерий. Клеточная стенка микобактерий состоит из нескольких слоев, она является наиболее сложной по структуре среди бактерий. Производные миколовых кислот, важнейших характерных для микобактерий туберкулеза (МБТ) соединений, образуют корд-фактор – фактор их вирулентности. В целом, различают ТБ легких, с которым чаще ассоциируется слово «туберкулез», и внелегочный ТБ, в том числе ТБ мозга, проблема лечения которого чрезвычайно актуальна, так как далеко не все лекарственные вещества способны проникать через гематоэнцефалический барьер [3, 29]. Основным видом, вызывающим это заболевание у человека, является *Mycobacterium tuberculosis*, хотя по ряду теорий, основанных на исследовании генома микобактерий, ТБ в древности пришел от животных, в том числе морских [30]. Микобактерии постоянно эволюционируют. Совместная эволюция паразита и хозяина привела к установлению равновесия между латентной формой, обусловленной персистирующими в организме МБТ, и активным туберкулезным процессом [31].

В развитии заболевания выделяют первичный и вторичный период. В случае адекватной защитной реакции организма первичное инфицирование не приводит к заболеванию, а в противном случае развивается первичный ТБ. Вторичный ТБ развивается за счет повторного заражения или реактивации остаточных посттуберкулезных изменений.

На начальном этапе болезни микобактерии находятся во внеклеточной среде и размножаются медленно. Однако со временем они проникают в лимфатическую систему и распространяются по всему организму, заселяя органы с развитой микроциркуляцией. В поражаемых ими участках происходит фагоцитоз, неспецифическая защитная реакция, однако она оказывается недостаточной в силу способности МБТ препятствовать образованию фаголизосом [29, 32, 33].

Восприимчивость к ТБ оказывается меньшей, если макрофаги вырабатывают повышенные количества оксида азота (NO) и пониженные количества

интерлейкинов IL-4 и IL-10, что, в частности, определяется гаплотипом лейкоцитарных антигенов пациента. Существенный вклад в развитие туберкулезного процесса вносит и геном микобактерий. Например, мутации штаммов МБТ в форме однонуклеотидных замен обостряют течение заболевания и повышают вероятность повторного заражения [34, 35].

Имеют значение и факторы врожденного иммунитета. Одним из них является секреция гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ). Нарушение сигнальных систем, связанных с ним, является причиной большей восприимчивости к ТБ, а также повышает вероятность развития диссеминированной инфекции после вакцинации БЦЖ. Лечение аутоиммунных заболеваний, направленное на подавление фактора некроза опухолей (TNF), также имеющего отношение к этой системе, повышает вероятность развития активного туберкулезного процесса. Взаимодействие Т-лимфоцитов с презентующими антигены клетками посредством IL-12 делает их способными поддерживать клеточный иммунитет.

В конце XX века были открыты Toll-подобные рецепторы. В частности, Toll играют роль в распознавании липоарабиноманнана, липоманнана и фосфатидилмио-инозитола маннозида в составе клеточной стенки МБТ. Молекулы активного витамина D<sub>3</sub>, лейкоцитарные ингибиторы протеазы и липокалин 2, стимулируемые Toll, обеспечивают врожденный иммунный ответ против микобактерий. Имеет значение и процесс аутофагии, предотвращающий воспаление и снижающий восприимчивость к ТБ. Аутолизосомы обладают существенно более высокой противомикробной активностью, чем фаголизосомы. Аутофагия может быть перспективна с терапевтической точки зрения, так как возможна ее модуляция с помощью лекарственных средств [36-38].

Исходя из рассмотренных особенностей возбудителя туберкулеза следует, что при разработке противотуберкулезных препаратов следует учитывать возможность их проникновения в клетки, поражаемые микобактериями, в частности, макрофаги. Также целесообразно разрабатывать инъекционные формы противотуберкулезных препаратов, в силу преимущественной локализации микобактерий в органах с развитой микроциркуляцией.

### 1.3 Основные противотуберкулезные препараты

В настоящий момент существует достаточно большое количество противотуберкулезных препаратов (ПТП), различных по своему происхождению, строению молекул и механизму действия. Поэтому в основе их классификации лежит специфическая активность и токсическое действие.

Так, по наиболее распространенной классификации к ПТП I ряда (высокой эффективности и относительно низкой токсичности) относят рифампицин (Рфм) и изониазид, а также этамбутол, стрептомицин и пиразинамид. К препаратам II ряда относят этионамид, протионамид, рифабутин, офлоксацин, канамицин, амикацин, капреомицин, пара-аминосалициловую кислоту (ПАСК), циклосерин. По другой классификации (Международного союза борьбы с туберкулезом) препаратами I ряда также являются рифампицин и изониазид как наиболее эффективные, препараты II ряда имеют среднюю эффективность (стрептомицин, канамицин, этамбутол, пиразинамид, протионамид, этионамид) и наименее эффективные (ПАСК, тиоацетазон) относятся к III ряду [39].

В стандартной химиотерапии ТБ применяются вышеперечисленные препараты I ряда. Фторхинолоны не были рекомендованы Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для лечения туберкулеза и применяются в случае резистентности к ПТП I ряда или их плохой переносимости [40].

Изониазид подавляет синтез ДНК и фосфолипидов, нарушает целостность клеточной стенки микобактерий. Он способен образовывать комплексы с ионами железа, жизненно важными для МБТ, и блокировать окислительные процессы. Рифампицин оказывает бактерицидное действие, так как нарушает процесс транскрипции у микобактерий. Важно, что и изониазид, и рифампицин создают высокие концентрации, как при внутриклеточной, так и при внеклеточной локализации возбудителя. Особенность пиразинамида в том, что он эффективен преимущественно в очагах казеозного некроза, для которых характерна кислая среда (рН до 5,5). В отличие от рифампицина и изониазида, он эффективен исключительно против локализованных внутри клеток микобактерий. Напротив,

большинство других ПТП: стрептомицин, канамицин, флоримицин, капреомицин, этамбутол, этионамид, протионамид, циклосерин, – действуют преимущественно против внеклеточных микобактерий. ПАСК и тибон оказываются малоэффективными, независимо от локализации возбудителя [3, 29].

Сведения о формах выпуска, способах введения и побочных эффектах обсуждаемых противотуберкулезных препаратов представлены в Табл. 1.

Таблица 1. Краткая справка об основных противотуберкулезных препаратах [40]

Препарат	Лекарственная форма	Способ введения; ежедневная дозировка	Побочные эффекты
Изониазид	Таблетки 50, 100 и 300 мг; суспензии 10 мг/мл	Перорально, внутривенно, внутримышечно; 5-15 мг/кг или 300 мг/сут	Гепатит, высыпания, периферическая нейропатия, токсичен для ЦНС
Рифампицин	Капсулы 150 и 300 мг; лиофилизаты 150 мг для приготовления растворов	Перорально, внутривенно; 10-20 мг/кг или 600 мг/сут	Гепатит, высыпания, гриппоподобный синдром, тромбоцитопения
Пиразинамид	Таблетки 500 мг	Перорально; 15-30 мг/кг	Гепатотоксичность, высыпания, гиперурикемия, светочувствительность, тошнота
Этамбутол	Таблетки 100 и 400 мг	Перорально; 15-25 мг/кг	Ретробульбарный неврит, высыпания
Стрептомицин	Лиофилизаты 500 мг для приготовления растворов	Внутривенно, внутримышечно; 15-20 мг/кг	Нефротоксичность, ототоксичность, вестибулярная токсичность, гипокалиемия, гипомагниемия
Левифлоксацин	Таблетки 250, 500 и 750 мг; растворы 5 мг/мл	Перорально, внутривенно; 500-1000 мг/сут	Тошнота, разрыв сухожилий, артралгия, нейротоксичность, кардиотоксичность
Моксифлоксацин	Таблетки 400 мг; растворы 1,6 мг/мл	Перорально, внутривенно; 400 мг/сут	Тошнота, разрыв сухожилий, артралгия, нейротоксичность, кардиотоксичность
Рифабутин	Капсулы 150 мг	Перорально; 5 мг/кг или 300 мг/сут	Гепатит, лейкопения, тромбоцитопения, увеит, высыпания, артралгия

Более эффективные препараты I ряда имеют бактерицидный характер действия, а также способны проникать в ткани, пораженные возбудителем. Менее

эффективные препараты, действуют преимущественно бактериостатически и плохо проникают в лишенные кровеносных сосудов казеозные массы и фиброзную ткань [41].

Таким образом, принципиально важна способность ПТП проникать в поврежденные участки легких и проходить через клеточную стенку МБТ, а также в клетки тканей, пораженных возбудителем. Кроме того, вызванные ТБ повреждения органов оказываются гетерогенными и содержат популяции микобактерий, находящихся в разных фазах роста и состояниях, что является основанием для применения комбинированной терапии.

При этом биораспределение лекарственного вещества зависит от строения патологической ткани, образованной МБТ. Так, ПТП второго ряда моксифлоксацин достигает более высокой концентрации в легочной ткани и гранулемах, чем в плазме крови, а для ПТП первого ряда изониазида, рифампицина и пиразинамида характерно лучшее распределение в неповрежденной ткани. В гранулемах достигается высокая концентрация моксифлоксацина, но она оказывается ниже терапевтического значения в некротических гранулемах, имеющих казеозный центр, куда он проникает существенно хуже, что только способствует росту резистентных популяций микобактерий. В настоящий момент единственным ПТП, способным эффективно проникать в казеозную ткань, где, в том числе, содержится большое количество персистирующих микобактерий, считается пиразинамид.

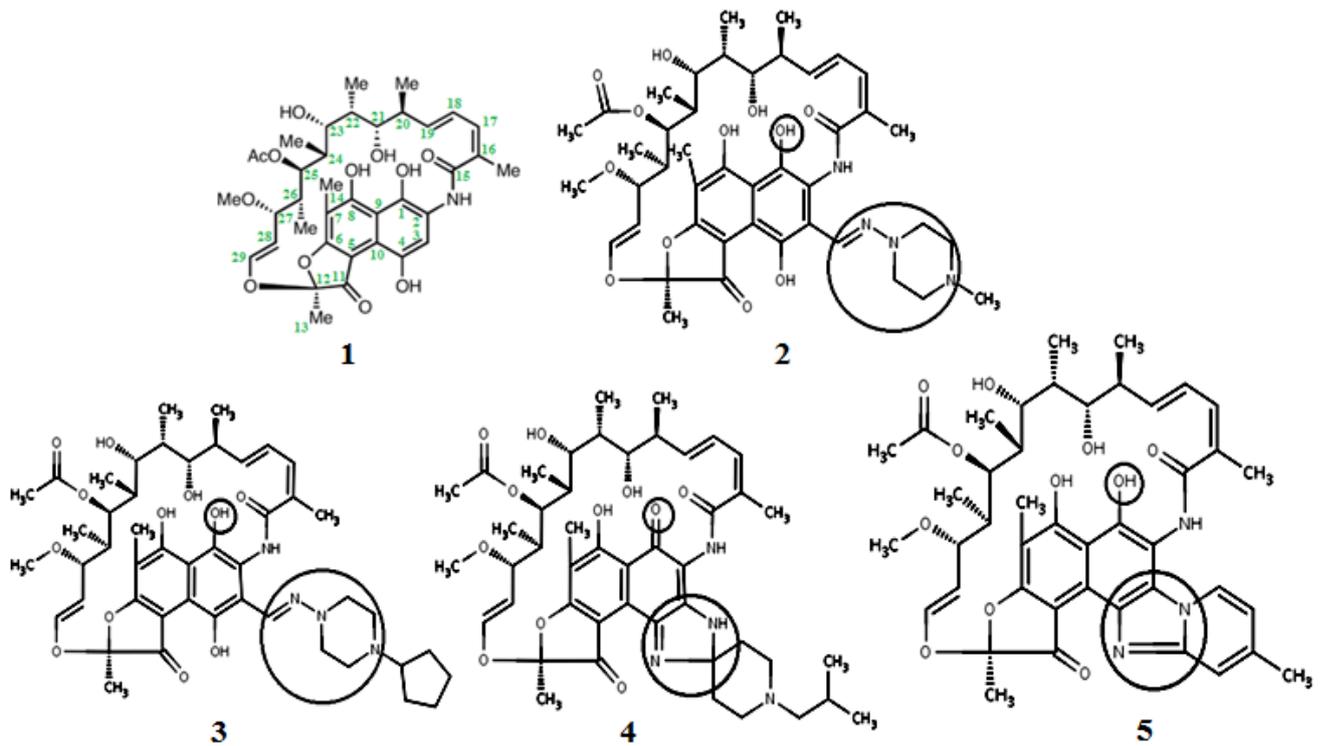
Часто недооценивают биотрансформацию антибиотиков и синтетических противомикробных препаратов, обусловленную микобактериями, принимая в расчет только метаболизм в организме пациента. В ряде случаев биотрансформация является благоприятным фактором, например, если исходное соединение выступает в качестве пролекарства. Например, пиразинамид под действием пиразинамидазы превращается в пиразиновую кислоту, обладающую противотуберкулезным действием [42].

Основой современной противотуберкулезной терапии являются антибиотики рифамицинового ряда. Они входят в семейство анзамицинов, характеризующихся

замкнутой циклической структурой молекулы, с ароматической и алифатической частью. В это же семейство входят стрептоварицины, толипомидины и галомицины (анзамицины с нафталиновым ядром в ароматической части), однако наибольшее практическое значение нашли рифамицины, благодаря обширным возможностям в химической модификации боковой цепи. Их действие обусловлено специфическим подавлением синтеза РНК у бактерий в результате образования комплекса с РНК-полимеразой [43]. Рифамицины продуцируются актиномицетами *Amicolatopsis mediterranei*. Наиболее активными природными рифамицинами являются рифамицин S и рифамицин SV, взаимно превращающиеся друг в друга посредством окислительно-восстановительных процессов [44].

Рифамицины характеризуются высокой противомикробной активностью, известно также об их эффективности против онкогенных вирусов. Одним из первых успешных продуктов был рифамицин SV, полученный из природного рифамицина В и выпущенный в 1962 г. под маркой Rifocin<sup>®</sup> – препарат против туберкулеза для парентерального применения. Через несколько лет было получено еще более эффективное формильное производное рифамицина SV, а с помощью его дальнейшей модификации – рифампицин (рифампин), ставший основным противотуберкулезным средством [45].

Для активности рифамицинов принципиально важна сохранность структуры алифатической цепи, а также гидроксильных групп в 21 и 23 положении (Рис. 1). Также известно, что модификации боковой цепи в 3 положении способны повышать активность рифамицинов против РНК-полимеразы резистентных клеток [46]. Рифамицины оказывают свое действие только перед началом очередного цикла полимеризации РНК: если инициация цепи уже произошла, то они не препятствуют дальнейшей элонгации. Связывание с РНК-полимеразой протекает быстро, в течение нескольких минут [47].



1 – рифамицин SV; 2 – рифампицин; 3 – рифапентин; 4 – рифабутин; 5 – рифаксимин. Окружностями обведены фрагменты молекул, различающиеся у соединений 2-5.

Рисунок 1. Структурные формулы рифамицинов

В настоящий момент среди одобренных FDA существует только 4 рифамициновых антибиотика: рифампицин, рифабутин, рифапентин (Рпт) и рифаксимин (Рфс). Так как последний (одобрен в 2004 г.) практически не всасывается из желудочно-кишечного тракта, в существующей пероральной форме он не применяется для лечения туберкулеза. Рифабутин, одобренный в 1992 г., в действительности показан преимущественно против нетуберкулезного комплекса микобактерий *M. avium*. Таким образом, только рифампицин и рифапентин предназначены непосредственно для лечения туберкулеза. Предполагалось также внедрение рифалазила, превосходящего рифампицин по эффективности, однако работа была приостановлена в связи с его существенными побочными эффектами [47].

Было установлено, что противотуберкулезная активность рифапентина сопоставима или несколько превосходит рифампицин как *in vivo*, так и *in vitro*. При этом рифапентин характеризуется большим значением ЛД<sub>50</sub> и в 5 раз более

длительным периодом полувыведения [48, 49]. По этой причине рифапентин в комбинированной терапии туберкулеза пациенту достаточно принимать 1-2 раза в неделю, в то время как рифампицин требует ежедневного приема. Основным назначением рифапентина, согласно предписанию FDA, является лечение легочной формы туберкулеза [50]. При этом следует учитывать, что рифампицин обладает большей эффективностью в туберкулезных кавернах, поэтому его применение целесообразнее в случае кавернозной стадии ТБ [51].

Современная стандартная схема противотуберкулезной терапии подразумевает два этапа лечения. На первом этапе, соответствующем острой фазе заболевания, пациенты получают 4 препарата первого ряда (в течение 2-3 месяцев). При этом важно, чтобы хотя бы 2 из этих ПТП были бактерицидными, а не бактериостатическими. Затем, на втором этапе (поддерживающей терапии), применяются 2 ПТП первого ряда, изониазид и рифампицин (в течение 4 месяцев). Назначение нескольких препаратов, обладающих разной биологической активностью и по-разному влияющих на вне- и внутриклеточные популяции микобактерий, обуславливает высокую эффективность лечения и предотвращает развитие лекарственной устойчивости возбудителя [52]. Аккуратное соблюдение режима терапии позволяет лечить большинство форм ТБ, чувствительных к рифампицину и изониазиду, однако такие проблемы, как некомплаентность, вызывают появление лекарственной устойчивости. Кроме того, побочные эффекты лечения рифампицином и изониазидом могут приводить к необходимости замены этих ПТП на менее эффективные. Для оптимизации терапии была разработана программа «лечения под непосредственным контролем коротким курсом» (DOTS), широко используемая с 1995 г., а далее в 2006 г. программа «Stop TB Strategy», дополнительно учитывающая неблагоприятные факторы в развитии заболевания, новые методы диагностики, терапии и лечения. Однако эти меры не позволяют в достаточной степени противостоять развитию лекарственной устойчивости [53, 54]. Больным, лечившимся нерегулярно или прервавшим лечение, рекомендуется назначение уже 5 препаратов (изониазид, рифампицин, пиразинамид, стрептомицин и этамбутол), а больным, у которых

выявлена полирезистентность микобактерий, назначают препараты II ряда: канамицин, амикацин, протионамид, этамбутол, а также фторхинолоновые антибиотики моксифлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин, ципрофлоксацин [52].

Таким образом, для улучшения качества химиотерапии туберкулеза требуются инновационные разработки.

С одной стороны, они предполагают принципиально новые лекарственные средства, в связи с чем необходим поиск альтернативных молекулярных мишеней МБТ. Разработки ведутся в области поиска ингибиторов биосинтеза миколовых кислот и жирных спиртов в составе клеточной мембраны, цикла трикарбоновых кислот, гомеостаза железа, перехода в дормантную форму, токсинов МБТ, эффлюксных насосов, электронного транспорта, а также воздействия на геном возбудителя посредством синтетических аналогов нуклеиновых кислот. Однако за последние 30 лет в клиническую практику практически не внедрились ПТП с новым механизмом действия, за редкими исключениями, например, линезолида и бедаквилина, применяющихся против полирезистентных форм туберкулеза. Известно об успешном испытании новой схемы лечения (ВРаМЗ), включающей в себя эти препараты [55-57].

С другой стороны, очевидно, что темп разработок в области новых ПТП недостаточен, поэтому необходимы более эффективные формы на основе уже имеющихся лекарственных субстанций. В том числе, такая стратегия существенно эффективнее экономически, так как не требует столь обширных биологических исследований.

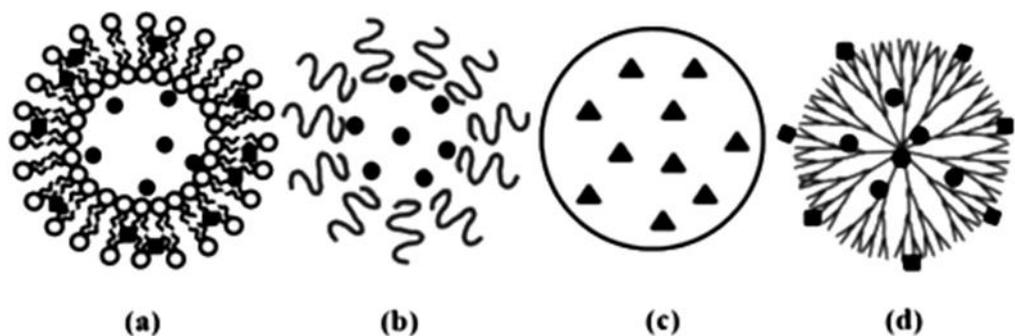
#### **1.4 Разработка инновационных форм противотуберкулезных препаратов**

Целью создания инновационных лекарственных форм является улучшение физико-химических и биологических характеристик действующего вещества: от изменения его растворимости до возможности целенаправленной доставки в органы-мишени.

Одну из самых сложных задач для фармацевтической технологии представляют труднорастворимые субстанции. По оценкам около половины применяемых в промышленности фармацевтических субстанций малорастворимы в воде. С биологической точки зрения низкая растворимость часто приводит к нестабильности всасывания активного вещества и, как следствие, сильному влиянию состава принимаемой пищи на биодоступность. По этой причине предпочтительнее применять инъекционные формы. Однако их получение ограничивается растворимостью субстанции, в то время как ее химическая модификация или подбор продрога не всегда представляются возможными. Для решения этой задачи применяются технологии повышения растворимости, в данном контексте обозначаемые термином «солубилизация» [58].

*Системы доставки.* Одним из способов солубилизации является разработка систем доставки на основе наноразмерных объектов, поскольку в этом случае возможно обеспечить не только контролируемое высвобождение активного вещества и целенаправленное воздействие на органы-мишени, но и изменение способа его введения, получение парентеральной формы. В фармацевтической нанотехнологии наноразмерными считают объекты, размер которых меньше 1 мкм, а наибольшей эффективностью обладают частицы размером 100-500 нм. Наночастицы возможно вводить внутривенно, при этом обеспечение оптимальной площади их поверхности позволяет достичь необходимой скорости высвобождения активного вещества [59].

К основным типам наноразмерных систем доставки лекарственных средств можно отнести липосомы, полимерные наночастицы, твердые липидные наночастицы, а также дендримеры (разветвленные полимеры с глобулярной структурой) (Рис. 2) [60]. Последние способны эффективно взаимодействовать с микроорганизмами и доставлять в них антибиотики, благодаря чрезвычайно высокой площади поверхности и амфифильной структуре, однако некоторые из них оказываются весьма токсичными [61].



(a) липосома; (b) полимерная наночастица со стерически стабилизированной поверхностью; (c) наночастица из твердых липидов; (d) дендример

Рисунок 2. Схематическое изображение различных типов систем доставки антибиотиков, получаемых методами нанотехнологии [60]

Для разработки наноразмерных систем доставки ПТП существуют благоприятствующие этому биологические предпосылки. Так, оказавшись в кровеносной системе, наночастицы взаимодействуют с организмом тем же образом, что и другие дисперсные системы, в том числе, и бактерии: они захватываются макрофагами системы мононуклеарных фагоцитов печени, селезенки и легких. Кроме того, макрофаги, пораженные МБТ, обладают повышенной фагоцитарной функцией, что ещё больше повышает эффективность доставки ПТП [62, 63]. Наночастицы из твердых липидов, можно полагать, также имеют особое преимущество за счет высокой гидрофобности клеточной стенки микобактерий, что делает ее более проницаемой для таких объектов [64, 65]. Кроме того, в силу характерной особенности МБТ заселять органы с развитой микроциркуляцией, преимущество в лечении обеспечит возможность парентерального введения таких препаратов.

Полимерные наночастицы получают из природных или синтетических полимеров: PLA, PLGA, поли-ε-капролактона, полиалкилцианоакрилатов и проч. С этой целью используются методы наноосаждения и гомогенизации, или полимеризации соответствующих мономеров. В результате образуется суспензия наночастиц, которую, в случае получения парентеральной формы, подвергают лиофильной сушке. Активное вещество можно адсорбировать на поверхности частиц после их формирования, включать в них в процессе получения частиц или же ковалентно соединять с полимером до получения частиц. Также существуют

нанокапсулы, полые внутри и содержащие масляную фазу с растворенным в ней активным веществом [60, 66]. Кроме того, полимерные наночастицы обладают еще двумя замечательными свойствами. Во-первых, многие патогенные микроорганизмы, включая микобактерии, существуют часто не в форме свободных клеток и колоний, а в форме биопленок. Даже чувствительные к тому или иному антибиотику бактерии ведут себя как резистентные, будучи заключенными в биопленки. Благодаря наночастицам, антибиотик может проникать через внеклеточный матрикс и высвободиться там [67, 68]. Во-вторых, наночастицы способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Эта способность принципиально важна для лечения туберкулеза мозга, в настоящее время плохо поддающегося химиотерапии. Особенно ярко выражена эта особенность у наночастиц на основе полибутилцианоакрилата, покрытых полиэтиленгликолем [69, 70].

Твердые липидные наночастицы (ТЛН), в отличие от полимерных, получают из жирных кислот, эфиров, глицеридов и других липидов, являющихся твердыми при комнатной температуре, а также эмульгаторов, наподобие лецитина и холата натрия. Они способны включать в себя как гидрофильные, так и гидрофобные вещества. Недостатком является невысокий процент включения, высокая остаточная влажность и возможные полиморфные переходы в процессе хранения. ТЛН, в основном, получают гомогенизацией под давлением и ультразвуком, с последующей распылительной сушкой. Технология позволяет избежать применения органических растворителей, так как липиды возможно расплавлять перед гомогенизацией [71, 72].

Липосомы были самыми первыми среди систем доставки (известны с 1960-х гг.). Они представляют собой липидные везикулы с мембраной, состоящей из амфифильных молекул. Липосомы вначале позиционировались как косметический продукт, а в 1995 г. был выпущен препарат Doxil<sup>®</sup>, липосомальная система доставки противоопухолевого антибиотика доксорубицина. Липосомы получают из липидов (обычно фосфатидилхолина и подобных) различными методами, например, путем гомогенизации или экструзии. С биологической точки

зрения преимуществом липосом является их структурное сходство с клеточными мембранами, благодаря чему они проникают в клетки-мишени, как хозяина, так и находящегося в них патогена [73]. Кроме того, липосомы способствуют восстановлению уровня фосфолипидов в поврежденном легочном сурфактанте, усиливают бактерицидное действие антибиотиков за счет небольшого количества перекисей липидов, имеющих в их составе, и стимулируют продукцию активных форм кислорода [74-76].

В качестве примера наносомальной формы ПТП можно привести рифампицин, включенный в наночастицы на основе PLGA. Его действие было испытано в отношении *M. bovis* BCG, и показано усиление противомикробной активности [77]. На основе PLGA была также разработана эффективная композиция с рифабутином против туберкулеза и *Helicobacter pylori*. Подобная композиция была разработана для D-циклосерина и ряда других лекарственных средств [78-80].

Аналогичные результаты были получены при изучении наносомальной формы моксифлоксацина на основе полибутилцианоакрилата. Использование наночастиц не только позволило повысить уровень внутриклеточных концентраций этого антибиотика, который и сам по себе хорошо проникает в клетки, но и замедляло выведение его из клетки, тем самым обеспечивая длительное воздействие на внутриклеточно локализованные микобактерии [81].

Препарат первого ряда изониазид также удалось включить в полибутилцианоакрилатные наночастицы, в результате чего повысилась внутриклеточная концентрация активного вещества в культуре моноцитов и усилено его противомикробное действие в отношении внутриклеточных МБТ [82]. Повышение внутриклеточных концентраций отмечалось и для стрептомицина, который в свободной форме медленно проникает в клетки [83].

Важно, что результаты, получаемые *in vitro*, воспроизводятся в экспериментах по изучению активности на моделях экспериментальных инфекций. Так, наносомальная форма рифампицина показала высокую терапевтическую эффективность при лечении стафилококкового сепсиса у

мышей: в группе, получившей внутривенно наносомальную форму Рфм, наблюдалось повышение химиотерапевтической эффективности рифампицина в 2 раза по сравнению со свободным антибиотиком. В случае сальмонеллезной инфекции (*S. typhimurium*) введение наносомальной формы Рфм в дозе 25 мг/кг приводило к излечению 80% животных, в то время как лечение свободным антибиотиком в дозе 50 мг/кг приводило к излечению не более 10% животных. Можно полагать, что высокая противобактериальная активность коллоидной формы рифампицина определяется его эффективным транспортом в макрофаги [84].

Антибиотик рибостамицин, обладающий противотуберкулезной активностью, имеет существенный недостаток: выраженное нефротоксическое действие. Хитозановые частицы с включенным в них рибостамицином позволяют существенно уменьшить его токсичность, а также расширить спектр действия и повысить его эффективность [85].

Весьма перспективным полимером для получения наносомальных форм ПТП оказывается альгинат натрия. Технологический процесс с его применением позволяет избежать использования органических растворителей, при этом удается достичь высокого массового отношения между включенным веществом и полимером, вплоть до 1:1. Кроме того, благодаря гидрофильной природе альгината, клиренс таких наночастиц мононуклеарной фагоцитарной системой протекает существенно медленнее, чем у наночастиц на основе более гидрофобных полимеров, что обеспечивает длительную циркуляцию в кровотоке [86].

Липосомальные формы оказываются более эффективными при ингаляционном введении, чем при внутривенном. Это объясняется характером их биораспределения при этих путях введения, что было подтверждено на примере липосом с рифампицином: в легкие попадает в 10 раз больше липосомального антибиотика, если он вводился интратрахеально [87, 88].

*Нанокристаллы, комплексы и твердая дисперсия.* Повышения коллоидной растворимости лекарственного вещества можно достичь и без включения его в

матрицу из вспомогательных веществ. Так, технология нанокристаллов, разработанная в Elan Nanosystems, долгое время считалась «золотым стандартом» в данной отрасли. Она заключается в измельчении порошка субстанции до наночастиц кристаллической структуры с добавлением ПАВ для предотвращения агрегации частиц [58]. Нанокристаллы пригодны как для повышения биодоступности *per os*, так и для ингаляционного или внутривенного введения. Преимущество технологии в том, что большинство лекарственных субстанций возможно перевести в форму нанокристаллов, а также они обеспечивают лучшую стабильность лабильных соединений. Основными методами получения нанокристаллов являются перемалывание, гомогенизация высокого давления и наноосаждение, с последующей лиофилизацией в случае, если лекарственная форма парентеральная [89].

Синтетическое противомикробное средство клофазимин обладает активностью против микобактерий. Однако очень низкая растворимость в воде накладывает ограничение на его применение. Для преодоления этого ограничения было предложено получить нанокристаллы из субстанции клофазимина (размером менее 400 нм), стабилизированные поверхностно-активными веществами. В результате внутривенного введения такой суспензии была существенно снижена микробная обсемененность *M. avium* печени, легких и селезенки мышей, на которых воспроизводилась соответствующая экспериментальная инфекция. Эти данные хорошо коррелировали с фармакокинетикой такой формы клофазимина: концентрация активного вещества существенно превышала минимальную подавляющую концентрацию (МПК) в целевых органах. Нанокристаллы оказались равноэффективными с системой доставки клофазимина в форме липосом, которые использовались в контрольном эксперименте [90].

Параллельно с этими направлениями в фармацевтической технологии развивается группа методов, обозначаемых как «твердая дисперсия» — многокомпонентная система, состоящая из лекарственного вещества и носителя, в результате чего образуется твердый раствор или высокодисперсная взвесь

активного вещества в матрице носителя. Основным назначением технологии является повышение растворимости и скорости растворения, биологической доступности лекарственных веществ в случае перорального приема. Так, твердая дисперсия с полиэтиленгликолями (ПЭГ) повышает растворимость рифампицина в 3,50 раза, протионамида в 2,56 раза. Технология достаточно разнообразна, существует множество ее исполнений, например, метод удаления растворителя, метод сплавления, метод совместного измельчения, замешивания и другие. Недостатками технологии, однако, являются возможные дестабилизация активного вещества, снижение активности антибиотиков, усиление побочных эффектов [91].

Известно о применении технологии твердой дисперсии для рифабутина. С помощью метода удаления растворителя была получена микронизированная форма, в качестве носителей были использованы ПЭГ и полуксамеры нескольких марок. В результате улучшилась смачиваемость субстанции, растворимость в воде увеличивалась практически в 3 раза, а за 10 мин в среде 0,01 н соляной кислоты растворялось 50% рифабутина, в то время как в контроле (субстанция) только 23%. Методом ДСК было показано благоприятное влияние гидрофильных полимеров на твердое состояние рифабутина. Стабильность состава не ухудшилась по сравнению с контролем, однако не были приведены сведения об активности и токсичности [92].

Подобный подход был применен и для рифапентина с использованием поливинилпирролидона и гидроксипропилметилцеллюлозы в качестве носителей. Отмечалось вплоть до 10-кратного повышение растворимости рифапентина [93]. Для повышения растворимости и скорости растворения рифапентина также применялся метод сплавления с несколькими ПЭГ и полуксамерами [94]. Тем не менее, в этих случаях целью работы было повышение растворимости преимущественно для улучшения пероральной формы, а не получения парентеральной.

В качестве альтернативы применяется технология «комплексов включения». Наиболее часто используемыми для этого вспомогательными веществами

являются циклодекстрины. Преимущество комплексов в том, что включенное вещество оказывается в аморфном состоянии, превосходящем кристаллическое по растворимости и скорости растворения. Для получения комплексов, в основном, применяют перетирание и метод удаления растворителя. При этом эффективность образования комплекса существенно зависит от метода получения [95, 96].

*Соразтворители, технология *in situ**. Помимо рассмотренных методов, увеличить истинную или коллоидную растворимость активного вещества в воде возможно с использованием фармацевтически приемлемых растворителей (этанол, пропиленгликоль, ДМСО) и биосовместимых ПАВ (Cremophor<sup>®</sup>, Solutol<sup>®</sup>, полисорбаты), а также масел (соевое, сафлоровое). Однако применение масел ограничивается областью устойчивости эмульсии, а растворители могут вызывать раздражение, гемолиз и усиливать побочные эффекты активного вещества [97]. Добавление в композицию соответствующих ПАВ, хотя они допускаются к применению в фармацевтической промышленности, также может приводить к нежелательным явлениям. Так, Cremophor<sup>®</sup> EL, содержащийся в ряде парентеральных форм химиотерапевтических средств, например, паклитаксела (Taxol<sup>®</sup>) и иксабепилона (Ixempra<sup>®</sup>), способен вызывать нарушения в дыхании, ангионевротический отек, тахикардию и гипотензию, серьезные аллергические реакции [98].

Применяя солюбилизирующие вещества природного происхождения или их полусинтетические производные, можно достичь желаемого повышения растворимости активного вещества, не усиливая при этом токсичности композиции. Например, водорастворимое производное витамина E D- $\alpha$ -токоферилполиэтиленгликольсукцинат (TPGS) способен эффективно солюбилизовать труднорастворимые в воде соединения. Его поверхностная активность в 77 раз выше, чем у поливинилового спирта, который также зачастую применяется в качестве солюбилизатора. Кроме того, TPGS способен продлевать период полувыведения активного вещества и усиливать его поглощение целевыми клетками. Его достаточно высокое значение гидрофильно-липофильного баланса (13,2) и сравнительно низкая критическая концентрация

мицеллообразования (0,02 масс.%) предполагают использование этого ПАВ для создания прямых мицеллярных систем, солюбилизирующих липофильные соединения. В том числе, предполагается его способность предотвращать лекарственную резистентность. Его значение ЛД<sub>50</sub> (*per os*) превышает 7000 мг/кг, эмульгатор считается безопасным и одобрен FDA для использования в фармацевтической промышленности, при этом не обладает побочными эффектами Cremophor<sup>®</sup> и мог бы эффективно заменить его в ряде составов. Немаловажна также и собственная химическая стабильность TPGS, несмотря на восстановительную природу токоферола. Проводилась разработка супердженерика препарата Taxol<sup>®</sup> с использованием TPGS в качестве эмульгатора. В результате период полувыведения паклитаксела возрастал более, чем в 5 раз, значение AUC возрастало на 360%, переносимость введения улучшалась на 400%. Известно и о преимуществе TPGS над полуксамером F127: солюбилизация активных веществ протекает более эффективно, состав обладает пониженной токсичностью [99-101].

Особый интерес вызывают высокомолекулярные ПАВ природного происхождения, в частности, белки. Такие биополимеры не только снижают межфазное натяжение, но и обеспечивают электростатическую стабилизацию дисперсной системы, изменяют вязко-эластические свойства межфазной поверхности, повышают вязкость дисперсионной среды, создают стерический фактор стабильности. Белки характеризуются достаточно высокой адсорбционной способностью. Адсорбированные белки изменяют свою конформацию наиболее благоприятным образом для обеспечения коллоидной устойчивости, поэтому они оказываются более эффективными стабилизаторами, чем синтетические низкомолекулярные ПАВ, несмотря на меньшую поверхностную активность. Для этих целей используются альбумины, желатин, белки молочной сыворотки. Кроме того, белки предотвращают нежелательную адсорбцию активного вещества из раствора на материале упаковки, позволяя таким образом избежать непреднамеренного снижения вводимой дозы таким образом. Следует помнить при этом, что структура белка нуждается в защите в ходе технологического

процесса. Поэтому необходимо дополнительно добавлять в состав криопротекторы (углеводы, спирты, аминокислоты) для предотвращения денатурации белка [102, 103].

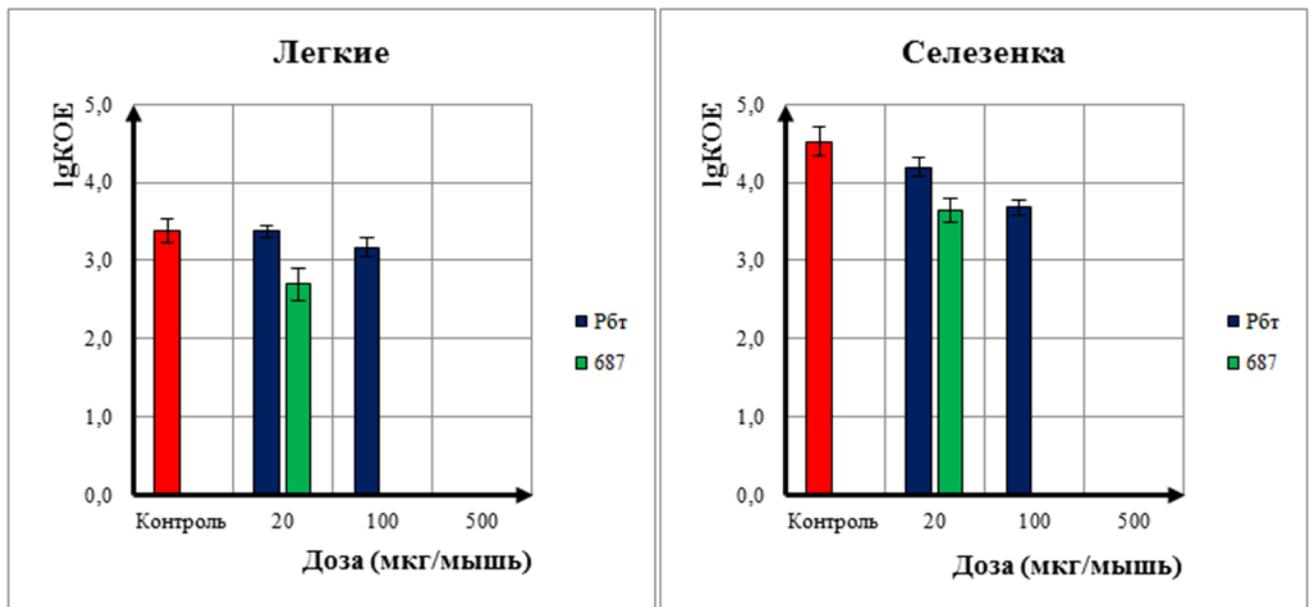
Наиболее привлекательной с точки зрения применения белков для солюбилизации является так называемая «технология nab» (nanoparticle albumin-bound). Она подразумевает получение «альбуминовых наночастиц», которые в действительности существенно отличны от вышеописанных полимерных наночастиц и ТЛН: имеется в виду коллоидная стабилизация наноразмерных частиц субстанции молекулами белка и дополнительная стабилизация за счет связывания лекарственного вещества с белком.

Ярким примером успеха этой технологии является препарат Abрахане<sup>®</sup> (nab-паклитаксел), зарегистрированный в 2006 г. Технология весьма проста в исполнении, она заключается в получении простой эмульсии, в которой белок находится в водной фазе, а активное вещество в органической фазе, с последующим удалением растворителя. Полагают, что при этом дополнительную стабилизацию также обеспечивают поперечные сшивки между молекулами белка, образующиеся в процессе гомогенизации [104]. Кроме того, отмечается высокая прочность комплекса между альбумином и паклитакселом. При этом молекула альбумина связывает более 6 молекул паклитаксела, одна из которых образует прочную связь с белком (значение константы ассоциации  $\sim 10^6$  л/моль) [105].

Этот супердженерик паклитаксела, в отличие от препарата Тахол<sup>®</sup> и его аналогов, в составе которых присутствует Cremophor<sup>®</sup> EL, характеризуется меньшей токсичностью, лучшей эффективностью, допускает повышение дозы (от 175 до 260 мг/м<sup>2</sup>), требует на порядок менее длительного времени для процедуры введения и не нуждается в премедикации [104]. Повышение эффективности паклитаксела, можно полагать, обусловлено усилением трансцитоза активного вещества, благодаря альбумину (посредством взаимодействия с рецепторами GP60 и активации кавеолина-1) [106, 107].

Технология *nan* была с успехом применена и для других лекарственных средств: доцетаксела, рапамицина, таксана СУ196, гелданамицина, тиоколхицина [104, 108].

Перспективен данный подход и в химиотерапии туберкулеза. Солюбилизация человеческим сывороточным альбумином была применена в отношении антибиотика рифабутина, при этом использовался метод наноосаждения в водный раствор белка из раствора антибиотика в этаноле. Размеры частиц в полученном составе не превышали 800 нм, а с разбавлением составляли десятки нанометров. При лечении экспериментальной острой туберкулезной инфекции мышей внутривенная форма рифабутина была эффективнее субстанции рифабутина, вводимой перорально даже в минимальной лечебной дозе 20 мкг/мышь (Рис. 3) [109, 110].



Р67 – субстанция рифабутина; «687» – водосовместимая форма рифабутина

Рисунок 3. Сопоставление эффективности пероральной субстанции рифабутина и внутривенной формы на основе человеческого сывороточного альбумина [109, 110]

Таким образом, существует множество разнообразных технологических подходов для получения парентеральных форм противотуберкулезных средств, от методов повышения растворимости до создания систем доставки. Проще в

исполнении методы солюбилизации поверхностно-активными веществами, из которых наиболее перспективна технология *nan*. В этом случае не происходит контролируемого высвобождения лекарственного вещества, однако не возникает проблемы низкого включения активного вещества и неоптимальной скорости высвобождения, плохой воспроизводимости технологии. В данном исследовании была применена солюбилизация человеческим сывороточным альбумином в отношении антибиотика рифапентина.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Оборудование и реактивы

Для получения водосовместимых коллоидных форм антибиотиков было использовано следующее оборудование и реактивы.

Оборудование: спектрофотометр Helios Zeta (Thermo Fisher Scientific, США); дистиллятор D-30938 (GFL, Германия); весы аналитические GH-200 (A & D, Япония); весы технические Сартосом (Россия); магнитная мешалка MS-3000 (Biosan, Латвия); ультразвуковая баня (UC-02, Lab Companion, Корея); центрифуга 5415R (Eppendorf, Германия); диспергатор Ultra-Turrax T18 (IKA, Германия); гомогенизатор высокого давления Emulsiflex-C5 (Avestin, Канада); ультразвуковой гомогенизатор Sonopuls HD2070 (Bandelin, Германия); лиофильная сушилка Alpha-Christ 2-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Германия); анализатор наночастиц Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Великобритания); система капиллярного электрофореза Капель 105 М (Люмэкс, Россия); хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США); автоматический гематологический анализатор Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия); автоматический биохимический анализатор ChemWell (Awareness Technology Inc., США); автоматический анализатор мочи Laura Smart (Erba Лахема, Чехия); электрокардиограф ЭК1Т-07 («Аксион», Россия).

Реактивы: рифапентин, чистота 98,9% (CAS 61379-65-5, Luohe Nanjiesun Pharmaceutical Group Pharmacy, Китай); рифаксимин, чистота не менее 98% (CAS 80621-81-4, Sigma, США); альбумин человеческий сывороточный в виде 20% водного раствора, чистота не менее 95% (CAS 70024-90-7, Baxter, Австрия); желатин сукцинированный в виде 4% водного раствора (CAS 0009000-70-8, В. Braun, Германия); натрия казеинат (CAS 9005-46-3, Sigma, США); дихлорметан, ХЧ (CAS 75-09-2, Химмед, Россия); ДМСО, ХЧ (CAS 67-68-5, Химмед, Россия); ацетонитрил чистый для ВЭЖХ (CAS 75-05-8, J.T. Baker, Нидерланды).

## **2.2 Построение калибровочной зависимости для количественного определения рифапентина и рифаксимины**

Для количественного определения исследуемых антибиотиков был использован спектрофотометрический метод.

Для построения калибровочной зависимости  $A(c)$  готовили серии растворов рифапентина и рифаксимины последовательными разведениями исходных растворов. Предварительно регистрировали спектры растворов антибиотиков в ДМСО и в воде и по ним отмечали длину волны в максимуме поглощения. При данной длине волны регистрировали значения оптической плотности ( $A$ ) растворов по возрастанию концентраций ( $c$ ). Диапазон концентраций был выбран так, чтобы в этой области наблюдалась линейная зависимость, и значение  $A$  не превышало 1. При фиксированной длине волны получали зависимость  $A(c)$ , строили ее график, отмечали коэффициент детерминации для оценки пригодности полученной калибровки. Для регистрации спектров и построения калибровок в воде субстанции предварительно растворяли в ДМСО и полученные растворы добавляли в воду, содержание ДМСО в калибровочных растворах достигало не более 6 об.%.

## **2.3 Определение растворимости рифапентина и рифаксимины**

Для определения растворимости рифапентина и рифаксимины навески субстанций этих антибиотиков в количестве, заведомо избыточном относительно ожидаемой растворимости, помещали в пластиковые пробирки объемом 25 мл и диспергировали в воде с помощью встряхивателя типа «вортекс». Для ускорения растворения пробирки помещали на 15-20 ч в шейкер-инкубатор (200 об/мин; 37 °С).

После охлаждения до комнатной температуры пробирки вновь встряхивали, отбирали пробы и отделяли осадок центрифугированием (13200 об/мин; 30 мин). Супернатант разбавляли в необходимое количество раз, определяли оптическую плотность полученной пробы и по калибровочной зависимости (см. п. 2.2) определяли концентрацию антибиотиков и рассчитывали их растворимость.

Для рифапентина, помимо растворимости в воде, изучали также влияние на его растворимость ряда вспомогательных веществ и физических воздействий на субстанцию. В общей сложности было проведено 17 серий экспериментов (Табл. 2). В качестве растворителей использовали воду, а также водные растворы человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, 3 м/о%), маннита (5 м/о%), сукцинированного желатина (СЖ, 1 м/о%), казеината натрия (КН, 1 м/о%), Pluronic® F-68 (PF68, 1-2 м/о%) или их комбинации.

В опытах №№ 1-6 и 10-11 (Табл. 2) изучалась растворимость рифапентина в воде и водных растворах вспомогательных веществ. В опыте № 7 изучалось влияние ультразвуковой гомогенизации (70 Вт; 6 мин) на растворимость рифапентина в воде, а в опыте № 8 субстанцию вносили в воду не в сухом виде, а в виде раствора в дихлорметане (ДХМ, 1% от общего объема). Аналогичные процедуры проделывали в опытах №№ 10-15, используя в качестве растворителя водный раствор Pluronic® F-68 вместо воды. В опытах №№ 9, 16 и 17 осуществлялось высаживание субстанции в воду или раствор Pluronic® F-68 из ацетона (5% от общего объема). Растворители отгоняли при помощи роторного испарителя, и емкости оставляли открытыми.

Таблица 2. Изучение влияния вспомогательных веществ и обработки субстанции на растворимость рифапентина в воде (пояснение в тексте)

№№	Растворитель	Дополнительное физическое воздействие на субстанцию
1	Вода	-
2	Водный раствор ЧСА (3 м/о%)	-
3	Водный раствор маннита (5 м/о%)	-
4	Водный раствор, содержащий 3 м/о% ЧСА и 5 м/о% маннита	-
5	Водный раствор СЖ (1 м/о%)	-
6	Водный раствор КН (1 м/о%)	-
7	Вода	Гомогенизация ультразвуком
8	Вода с раствором субстанции в ДХМ	Гомогенизация ультразвуком
9	Вода с раствором субстанции в Me <sub>2</sub> CO	-
10	Водный раствор PF68 (1 м/о%)	-
11	Водный раствор PF68 (2 м/о%)	-
12	Водный раствор PF68 (1 м/о%)	Гомогенизация ультразвуком
13	Водный раствор PF68 (2 м/о%)	Гомогенизация ультразвуком
14	Водный раствор 1 м/о% PF-68 с раствором субстанции в ДХМ	Гомогенизация ультразвуком
15	Водный раствор 2 м/о% PF-68 с раствором субстанции в ДХМ	Гомогенизация ультразвуком
16	Водный раствор 1 м/о% PF-68 с раствором субстанции в Me <sub>2</sub> CO	-
17	Водный раствор 2 м/о% PF-68 с раствором субстанции в Me <sub>2</sub> CO	-

## **2.4 Получение водосовместимой формы рифапентина**

Для получения водосовместимой формы рифапентина использовали два подхода: метод наноосаждения и различные методы гомогенизации: с помощью высокоскоростного диспергатора, гомогенизатора высокого давления и ультразвукового гомогенизатора.

В обоих случаях компоненты растворяли в двух отдельных фазах, водной и органической, которые затем смешивали. Водная фаза представляла собой раствор белка, в органическом растворителе находился антибиотик. Принципиальное различие между двумя технологиями в том, что в методе наноосаждения органический растворитель хорошо смешивается с водой, а в методе гомогенизации не смешивается, что требует дополнительного оборудования для эмульгирования. При этом растворитель в любом случае должен быть летучим, чтобы его было легко устранить по окончании процесса.

Вначале осуществляли подбор наилучших условий для получения образцов. В качестве белка использовался человеческий сывороточный альбумин (3%). Затем в достигнутых условиях эксперимент повторяли с сукцинилированным желатином (1%) и казеинатом натрия (1%).

### **2.4.1 Метод наноосаждения**

Для получения серии образцов готовили водный раствор белка и органический раствор рифапентина в этаноле, ацетоне или ацетонитриле.

Органическую фазу по каплям добавляли в водную, перемешивая на магнитной мешалке со скоростью 350-550 об/мин. Далее продолжали перемешивание еще 3 ч с той же скоростью. Полученную суспензию фильтровали через пористый стеклянный фильтр с размером пор № 1. После фильтрации в суспензию добавляли маннит до концентрации 1 м/о% в качестве криопротектора для дальнейшей лиофилизации. Суспензию разливали по флаконам (1 мл в каждый), замораживали ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и лиофилизировали.

#### **2.4.2 Гомогенизация с помощью высокоскоростного диспергатора**

Для получения серии образцов готовили водный раствор белка и органический раствор рифапентина в дихлорметане.

Органическую фазу быстро добавляли в водную, затем смесь диспергировали (24000 об/мин; 2 мин). Полученную суспензию фильтровали через пористый стеклянный фильтр с размером пор № 1. Затем добавляли маннит до концентрации 1-5 м/о% и перемешивали еще 1 ч (450 об/мин) для наиболее полного удаления растворителя. Суспензию разливали по флаконам, замораживали и лиофилизировали.

#### **2.4.3 Гомогенизация высокого давления**

Для получения серии образцов готовили водный раствор белка и органический раствор рифапентина в дихлорметане.

Органическую фазу добавляли в водную; смесь предварительно гомогенизировали на диспергаторе (24000 об/мин; 2-10 мин). Грубую суспензию далее гомогенизировали в течение 5 мин под давлением 12000 psi. Конечную суспензию фильтровали и перемешивали 1 ч для удаления растворителя (или использовали роторный испаритель). Добавляли маннит (1-5 м/о%), разливали по флаконам, замораживали и лиофилизировали.

#### **2.4.4 Метод ультразвуковой гомогенизации**

Для получения серии образцов готовили водный раствор белка и органический раствор рифапентина в дихлорметане.

Органическую фазу добавляли в водную и гомогенизировали систему ультразвуком мощностью 70 Вт в течение 6 мин. Сосуд с гомогенизируемым составом охлаждали снаружи холодной водой со льдом. Полученную суспензию фильтровали и перемешивали 1 ч для удаления растворителя. Добавляли маннит (1-5 м/о%), разливали по флаконам, замораживали и лиофилизировали.

## **2.5 Получение водосовместимой формы рифаксими́на**

Для получения водосовместимой формы рифаксими́на использовались методы наноосаждения и гомогенизации, тем же образом, что описано выше для рифапентина.

## **2.6 Определение физико-химических параметров полученных образцов**

Полученные образцы водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на характеризовали с точки зрения содержания в них активного ингредиента, общего (в суспензии) и в водной фазе, и распределения частиц суспензии по размерам.

Также методом капиллярного электрофореза определяли содержание белка в образцах и методом ВЭЖХ оценивали влияние технологии на чистоту рифапентина.

Качество полученных лиофилизатов считали приемлемым, если после ресуспендирования (т.е. восстановления лиофилизата) в исходном объеме воды, из которого они были получены, образовывалась однородная суспензия, сохраняющая устойчивость в течение 3-4 ч при хранении в холодильнике.

### **2.6.1 Определение общего содержания рифапентина и рифаксими́на**

В лиофилизат добавляли 1 мл ДМСО и обрабатывали суспензию 5 мин на ультразвуковой бане. Осадок отделяли центрифугированием (13200 об/мин; 30 мин). Отбирали супернатант и в необходимое количество раз, в зависимости от загрузки антибиотика для получения образца, разбавляли ДМСО. Определяли концентрацию антибиотика в приготовленной пробе по калибровке (см. п. 2.2) и, исходя из разбавления, определяли его общее содержание в лиофилизате.

Также в качестве альтернативы использовали определение по калибровке в воде. Для этого лиофилизат ресуспендировали и разбавляли водой до растворения агрегатов и получения прозрачного раствора. Определяли содержание антибиотика в растворе и, исходя из разбавления, в исходном лиофилизате.

### **2.6.2 Определение содержания рифапентина и рифаксимина в водной фазе**

Кроме общего содержания антибиотиков в образцах, также определяли и их содержание в водной фазе суспензии, чтобы оценить повышение их истинной растворимости.

Лиофилизат ресуспендировали в 1 мл воды. Частицы отделяли центрифугированием (13200 об/мин; 30 мин). Отбирали супернатант, разбавляли водой в необходимое количество раз, чтобы концентрация антибиотика была в пределах диапазона концентраций калибровки. Определяли содержание антибиотика в приготовленной пробе и по нему, с учетом разбавления, рассчитывали его содержание в полученном супернатанте, которое соответствует содержанию в водной фазе.

Также изучали скорость растворения рифапентина из препарата, для чего лиофилизат ресуспендировали в 25 мл фосфатного солевого буфера (PBS, pH = 7,4) и помещали в шейкер (200 об/мин; 37 °C). В качестве сравнения те же действия проделывали для субстанции (см. п. 2.3). В определенные промежутки времени отбирали пробы, нерастворившееся вещество отделяли центрифугированием (13200 об/мин; 30 мин). Разбавляли супернатант водой в необходимое количество раз, определяли содержание антибиотика.

### **2.6.3 Определение размеров частиц**

Размеры частиц в суспензии оценивали методом фотон-корреляционной спектроскопии (метод лазерной дифракции с одновременной регистрацией рассеянного света во всем угловом диапазоне), с помощью анализатора наночастиц с гелий-неоновым лазером (длина волны 632,8 нм, угол рассеяния света 90°).

Данный метод основывается на принципе динамического рассеяния света, проходящего через среду, содержащую частицы. Он сочетает в себе процессы светорассеяния и броуновского движения, что позволяет оценивать распределение частиц по размерам.

В отличие от статического рассеяния, динамическое позволяет определить не интенсивность рассеянного света, а время жизни флуктуации концентрации частиц. Она отражается в корреляционной функции, которая связана с коэффициентом диффузии. Коэффициент диффузии зависит от гидродинамического диаметра частицы [111, 112]:

$$D = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times d}, \text{ где:} \quad (1)$$

$\eta$  – вязкость среды (Па × с);

$T$  – температура среды (К);

$d$  – гидродинамический диаметр частицы (м);

$D$  – коэффициент диффузии (м<sup>2</sup>/с).

Полученные данные представляли как средний по пикам распределения диаметр частиц и индекс полидисперсности, отражающий ширину распределения.

Для оценки распределения по размерам (условия «без разбавления») образец ресуспендировали в 1 мл воды и помещали в кювету. Использовались следующие условия измерения:

- температура образца – 25 °С;
- время термостатирования – 120 с;
- вязкость дисперсионной среды – 0,887 мПа × с;
- коэффициент преломления дисперсионной среды – 1,330;
- коэффициент преломления образца – 1,590;
- абсорбция образца – 0,010;
- вязкость образца: считается равной вязкости дисперсионной среды;
- продолжительность измерения – автоматическая («по умолчанию»);
- количество измерений – 4;
- интервал между измерениями – 0 с.

Для приготовления пробы использовалась очищенная вода класса I (EasyPure UV 1053, BarnStead Thermolyne, США).

#### 2.6.4 Определение белка в образцах

Предварительно убеждались в стабильности структуры ЧСА методом нативного электрофореза, используя источник питания Эльф-4 (ООО «НПО «ДНК-Технология»). Во всех анализируемых образцах ЧСА-Рпт содержимое флакона разбавляли до концентрации ЧСА 2 мг/мл (рабочий раствор). Для приготовления раствора образца ЧСА-Рпт готовили смесь, содержащую 20 мкл рабочего раствора, 20 мкл буфера и 5 мкл раствора бромфенолового синего. Для проведения электрофореза использовали электродный буфер без SDS. Исходные параметры: 200 В; 43 мА; 8,6 Вт. Через 1 ч 13 мин: 200 В; 18 мА; 3,6 Вт.

Далее для определения содержания белка в лиофилизате использовали капиллярный электрофорез. Метод базируется на электрокинетических явлениях: перемещении заряженных частиц и электроосмосе, – что наблюдается при приложении к ним мощного электрического поля. В случае многокомпонентного состава происходит его разделение, так как электромиграция специфична для каждого сорта частиц [113].

В работе использовали систему капиллярного электрофореза с детектором светопоглощения. В качестве фонового электролита использовали тетраборатный буфер (рН = 9,2). Параметры определения были следующими:

- рабочее напряжение  $U = 15$  кВ;
- температура термостата  $t = 25$  °С;
- давление ввода пробы  $P = 30$  мбар;
- капилляр кварцевый, с диаметром  $\varnothing = 75$  мкм и соотношением общей и эффективной длины  $L_{\text{общ.}}/L_{\text{эфф.}} = 60$  см / 50 см;
- детектирование белка осуществлялось при длине волны  $\lambda = 214$  нм.

Предварительно строилась калибровочная зависимость в диапазоне концентраций белка от 1 до 15 мкмоль/л на основании площади пика белка, по которой определяли его содержание в водосовместимой форме антибиотика.

### 2.6.5 Оценка чистоты рифапентина методом ВЭЖХ

Для рифапентина была разработана методика определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазном варианте. Использовали жидкостной хроматограф с диодноматричным детектором поглощения.

Условия определения рифапентина были следующими:

- колонка Zorbax XDBCB-C<sub>18</sub> Eclipse (силикагель с октадецилсиланом), с длиной 150 мм, диаметром 3 мм и размером гранул сорбента 5 мкм;
- подвижная фаза: подщелоченный раствор 0,02 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> и ацетонитрил, взятые в соотношении 21:33;
- скорость подачи подвижной фазы  $V = 0,6$  мл/мин;
- температура в колоночном отсеке  $t = 40$  °С;
- время регистрации одной хроматограммы  $\tau = 10$  мин;
- длины волн детектирования составляли 336 и 478 нм, с шириной полосы 4 нм и репером  $700 \pm 100$  нм.

Для получения подвижной фазы готовили водный раствор КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> с концентрацией 0,02 моль/л. Для защиты колонки от пыли раствор фильтровали через нейлоновую мембрану (размер пор 0,45 мкм). Раствор подщелачивали для получения буфера, добавляя 10% NaOH в расчете 30 мкл на 21 мл. После этого смешивали полученный буфер с 33 мл ацетонитрила. Полученную систему использовали в качестве подвижной фазы.

Вначале регистрировали хроматограмму стандартного образца. Для приготовления раствора стандарта отвешивали 5, 10 и 20 мг рифапентина и растворяли в 5, 10 и 20 мл метанола, соответственно. Исходный раствор с концентрацией 1 мг/мл разбавляли в 20 раз подвижной фазой и для полученной пробы непосредственно уже осуществлялось измерение.

Для получения хроматограммы образца водосовместимой формы рифапентина готовили пробу следующим образом. В тщательно растертый лиофилизат добавляли 10 мл метанола, встряхивали. Суспензию помещали на 3 мин в ультразвуковую баню. Затем отбирали из флакона 0,9 мл в пробирки

для центрифугирования и отделяли осадок (6000 об/мин; 5 мин). Отбирали 50 мкл супернатанта и разбавляли 950 мкл подвижной фазы. Регистрировали хроматограмму полученной пробы.

На хроматограмме отмечали расположение пика основного вещества и пиков примесей, соответствие времени выхода основного пика на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора. Процент площади пика основного вещества расценивали как степень его чистоты. Также, зная концентрацию стандартного раствора, для сопоставления со спектрофотометрическим методом определяли содержание рифапентина в образце:

$$c(\text{Rp}) = \frac{c_{\text{ст.}} \times S_{\text{пр.}}}{S_{\text{ст.}}} \times 20 \times 10 \times 0,001, \text{ где:} \quad (2)$$

$c_{\text{ст.}}$  – концентрация пробы стандартного раствора рифапентина (50 мкг/мл);

$S_{\text{ст.}}$  – площадь пика на хроматограмме пробы стандартного раствора, среднее по 3 измерениям (мА x с);

$S_{\text{пр.}}$  – площадь пика на хроматограмме пробы образца водосовместимой формы рифапентина (мА x с);

20, 10 и 0,001 – переводные коэффициенты, учитывающие, соответственно, разбавление пробы, объем исходной суспензии и соответствие между миллиграммами и микрограммами;

$c(\text{Рпт})$  – содержание рифапентина в лиофилизате (мг/мл).

## 2.7 Оценка воспроизводимости технологии

Для оценки воспроизводимости наиболее успешные методики повторяли не менее трех раз, соблюдая неизменность параметров эксперимента. В тех же условиях, при которых наблюдались наилучшие характеристики образцов, получали несколько серий. Полученные серии образцов сравнивали по следующим параметрам: общее содержание антибиотика и его содержание в водной фазе, размеры частиц и индекс полидисперсности.

## 2.8 Принцип построения эксперимента и статистической обработки данных

В рамках исследования проводили подбор оптимальных условий для получения образцов водосовместимых форм рифапентина и рифаксимиона (пп. 2.4, 2.5). Принцип работы был близок тому, что используется в моделировании многофакторного эксперимента (однако уравнение регрессии не строили в силу невозможности однозначно определить критерий оптимизации и большого количества независимых переменных).

Сущность такого эксперимента в том, что задаются некоторые начальные условия и далее поочередно варьируются входные переменные. Отмечают, как это влияет на выходные переменные и делают вывод о характере зависимости [114].

В данной работе за начальные условия принимали определенную концентрацию белка в водной фазе, объемное соотношение между водной и органической фазой, концентрацию антибиотика в органическом растворителе, исходя из растворимости антибиотика в нем, и параметры перемешивания или гомогенизации. Далее варьировали соотношение фаз, загрузку антибиотика, скорость и время перемешивания, мощность и время гомогенизации, а также содержание криопротектора в конечной суспензии. Концентрация белка в водной фазе и параметры лиофильной сушки во всех случаях были одинаковыми.

Целью экспериментов было достижение наибольшего содержания антибиотика в препарате при сохранении устойчивости суспензии, что коррелировало с размером частиц. После достижения такого оптимума оценивали воспроизводимость методики (п. 2.7). Для этого в одинаковых условиях получали по 3 партии лекарственных форм и в каждой из них определяли характеристики: содержание антибиотика и распределение частиц по размерам; измерения повторяли 4 раза. В результате получали выборки, равные по количеству числу партий ( $n = 3$ ), каждая из которых имела объем, равный числу измерений ( $m = 4$ ). Таким образом, получали 3 выборки по 4 элемента в каждой.

Полученные выборки сравнивали между собой, используя статистические критерии для случая  $n = 3$ ,  $m = 4$  и уровня значимости  $P = 0,05$ . Критерии сравнения выбирали, исходя из поставленной задачи и типа распределения данных.

Для оценки характера распределения числовых данных отмечали, в первую очередь, среднее значение ( $\bar{X}$ ) и стандартное отклонение ( $S$ ). Рассчитывали интервал между  $(\bar{X} + S)$  и  $(\bar{X} - S)$  и соотносили его с крайними значениями в выборке. Отмечали расположение значений в выборке относительно среднего. Достаточно симметричные распределения приближенно считали нормальными.

Для распределений, близких к нормальным, и в случае приблизительного равенства стандартных отклонений в выборках, использовали параметрический критерий Фишера ( $F$ ). Если возникали сомнения в характере распределения, использовался непараметрический критерий Крускала-Уоллиса ( $H$ ), где реальные значения заменяются рангами в порядке возрастания.

Расчетные значения критериев  $F$  и  $H$  определялись следующим образом:

$$F = \frac{S_{\text{внешн.}}^2}{S_{\text{внутр.}}^2}; \quad (3)$$

$$H = \frac{12 \times D}{N \times (N + 1)}, \text{ где:} \quad (4)$$

$S_{\text{внутр.}}^2$  – средняя дисперсия по всем выборкам;

$S_{\text{внешн.}}^2$  – дисперсия между выборочными средними;

$D$  – дисперсия средних рангов;

$N$  – суммарная численность всех выборок.

Критические значения критерия подбирали для случая с  $m = 3$  выборками, содержащими  $n = 4$  элемента, ориентируясь на уровень значимости, равный 0,05. В таком случае  $F_{\text{кр.}} = 4,26$  и  $H_{\text{кр.}} = 5,692$ . Если выборки различались статистически незначимо, их объединяли в одну с 12 элементами и рассчитывали общий

доверительный интервал (критическое значение критерия Стьюдента в таком случае составляло 2,201) [115].

Также оценивали оптимальность достигнутых условий. Для расчета использовался метод Харрингтона. Он заключается в расчете т.н. «функции желательности», которая является мерой оценки достигнутых параметров. Для этого отмечают наилучший и наихудший из достигнутых параметров, которым будут соответствовать определенные весовые коэффициенты. От них, в свою очередь, зависит функция отклика и функция желательности:

$$a_1 = \frac{1,5}{|x_{\text{лучш.}} - x_{\text{худш.}}|}; \quad (5)$$

$$a_0 = 1,51 - a_1 \times x_{\text{лучш.}}; \quad (6)$$

$$y = a_0 + a_1 \times x; \quad (7)$$

$$d = e^{-e^{-y}}; \quad (8)$$

$$D = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n d_i}, \text{ где:} \quad (9)$$

$a_0$  и  $a_1$  – весовые коэффициенты;

$x_{\text{худш.}}$  и  $x_{\text{лучш.}}$  – наихудшее и наилучшее значение параметра;

$y$  – функция отклика;

$d$  – частная функция желательности по данному параметру;

$D$  – общая функция желательности по всем выбранным параметрам.

Образец тем ближе к оптимуму, чем ближе функция желательности к значению, равному 1. Достигнутые параметры считают удовлетворительными, если  $D \geq 0,37$  и хорошими, если  $D > 0,63$  [116].

## 2.9 Оценка параметров связывания антибиотиков с белками методом тушения флуоресценции

В получаемой водосовместимой форме рифапентина и рифаксимины одним из факторов, обеспечивающих повышение их растворимости по сравнению с субстанцией, является связывание с белками, входящими в состав лекарственной формы. Параметры связывания антибиотиков с белками определяли методом тушения флуоресценции. Данный метод основывается на том, что в результате связывания флуоресцентной молекулы с лигандом происходит тушение флуоресценции, причем изменение интенсивности флуоресценции характеризует прочность образовавшегося комплекса.

Характер тушения флуоресценции описывается моделью уравнения Штерна-Фольмера [117]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{\text{дин.}} \times [Q], \text{ где:} \quad (10)$$

$F_0$  – исходная интенсивность флуоресценции (у.е.);

$F$  – интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя (у.е.);

$K_{\text{дин.}}$  – константа динамического тушения флуоресценции (л/моль);

$[Q]$  – концентрация тушителя (моль/л).

Параметры образовавшегося комплекса вычисляли, используя уравнение (11) [118]:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \times \lg [Q], \quad \text{где:} \quad (11)$$

$n$  – стехиометрия комплекса;

$K_A$  – константа ассоциации (л/моль).

Готовили исходные растворы белка и антибиотика так, чтобы концентрация белка в таком растворе составляла 20 мкмоль/л, а концентрация антибиотика – 150 мкмоль/л. Их приготовление описано ниже в Табл. 3.

Таблица 3. Приготовление исходных растворов белков и антибиотиков для изучения их связывания

Соединение	Приготовление раствора	Концентрация раствора, мкмоль/л
Рпт	13,2 мг Рпт растворяли в 30 мл этанола и доводили объем водой до 100 мл.	150
Рфс	11,8 мг Рфс, растворяли в 30 мл этанола и доводили объем водой до 100 мл.	150
ЧСА	133,0 мг лиофилизата ЧСА растворяли в 100 мл PBS (рН = 7,4).	20
СЖ	Исходный раствор СЖ с концентрацией 4 м/о% разводили до 1 м/о% и смешивали 4,71 мл полученного раствора и 95,29 мл PBS.	20
КН	44,1 мг лиофилизата КН растворяли в 100 мл PBS.	20

Из полученных исходных растворов далее готовили пробы с различным молярным соотношением антибиотика и белка (от 0,5:1 до 7,5:1). Их приготовление описано в Табл. 4.

Регистрировали спектры флуоресценции растворов, задавшись определенной длиной волны поглощения  $\lambda_{ex}$  (для ЧСА и КН 295 нм, для СЖ 330 нм). Отмечали длину волны испускания  $\lambda_{em}$  и интенсивность флуоресценции F. Выполняли расчет по уравнениям (10) и (11), делали вывод о характере тушения флуоресценции и рассчитывали параметры образования комплекса.

Таблица 4. Приготовление растворов с различным соотношением белка (Б) и антибиотика (А) для флуориметрического исследования

№№	Объем добавляемого раствора, мл				с <sub>Б</sub> , мкмоль/л	с <sub>А</sub> , мкмоль/л	с <sub>А</sub> /с <sub>Б</sub> , моль/моль
	20 мкМ Б	150 мкМ А	PBS	Всего			
1	1,800	-	1,800	3,600	10,0	-	-
2	1,800	0,024	1,776	3,600	10,0	1,0	0,10
3	1,800	0,060	1,740	3,600	10,0	2,5	0,25
4	1,800	0,120	1,680	3,600	10,0	5,0	0,50
5	1,800	0,180	1,620	3,600	10,0	7,5	0,75
6	1,800	0,240	1,560	3,600	10,0	10,0	1,00
7	1,800	0,360	1,440	3,600	10,0	15,0	1,50
8	1,800	0,480	1,320	3,600	10,0	20,0	2,00
9	1,800	0,600	1,200	3,600	10,0	25,0	2,50
10	1,800	0,720	1,080	3,600	10,0	30,0	3,00
11	1,800	0,840	0,960	3,600	10,0	35,0	3,50
12	1,800	0,960	0,840	3,600	10,0	40,0	4,00
13	1,800	1,200	0,600	3,600	10,0	50,0	5,00
14	1,800	1,800	0,000	3,600	10,0	75,0	7,50

## 2.10 Экспериментальное изучение эффективности водосовместимой формы рифапентина

Исследование было выполнено в лаборатории ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболensk) под руководством д.б.н. В.Д. Потапова.

Эксперименты на животных выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [119]. Животные содержались в стандартных условиях, получая корм и воду *ad libitum*.

### 2.10.1 Получение экспериментального препарата

Для получения водосовместимой формы рифапентина использовался метод ультразвуковой гомогенизации, описанный в п. 2.4. Загрузка рифапентина на одну серию составляла 100 мг на 12,5 мл. Препарат характеризовали тем же образом, что описано в п. 2.6.

### 2.10.2 Моделирование туберкулезной инфекции у мышей

В работе был использован штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Бактерии культивировали в модифицированной жидкой среде Middlebrook 7H9 (HiMedia, Индия) с добавлением 10% обогащающей ростовой добавки (OADC) и 0,05% Твин-80 в течение 21 сут. при температуре 37 °С во флаконах объемом 100-500 мл с аэрацией в атмосферном воздухе (без CO<sub>2</sub>). Культуры выращивали до оптической плотности, соответствующей  $5 \times 10^7 \div 1 \times 10^8$  КОЕ, замораживали и хранили при температуре -70 °С. Для подтверждения концентрации живых бактерий в замороженных аликвотах делали контрольные высевы на чашки Петри со средой Middlebrook 7H11 (HiMedia, Индия).

Для подготовки заражающей суспензии клетки размораживали при комнатной температуре и гомогенизировали инсулиновым шприцем в асептических условиях. Готовили десятикратные разведения суспензии в физиологическом растворе, содержащем 0,05% Твин-80. Часть приготовленной суспензии использовали для контрольного посева на плотную питательную среду Middlebrook 7H11 с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота.

Исследования были проведены на мышах самках линии Balb/C с массой тела 20-22 г. Суспензию микобактерий вводили в боковую хвостовую вену мышей в дозе  $5,9 \times 10^6$  КОЕ/мышь, что приводило к развитию острого туберкулезного процесса.

### 2.10.3 Лечение животных

Исходный раствор водосовместимой формы рифапентина готовили, растворяя лиофилизат в 1 мл воды для инъекций.

Исходный раствор субстанции готовили, растворяя 30 мг рифапентина в 0,3 мл этанола и доводя объем до 5 мл дистиллированной водой.

Перед введением животным исходные растворы разводили водой для инъекций так, чтобы объем вводимой дозы составлял 0,1 мл. Все растворы использовали в течение 24 ч.

Зараженные животные были разделены на 7 групп по 10 особей: 3 группы мышей получали субстанцию рифапентина перорально в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, эквивалентных лечебным дозам для человека; 3 группы получали растворимую форму внутривенно в тех же дозах; 1 группа инфицированных животных, не получавших лечения, служила контролем. Лечение мышей начинали на 7 сутки после заражения. Препараты вводили 3 раза в неделю в течение 4 недель.

#### **2.10.4 Оценка результатов лечения**

Через 35 суток после окончания курса терапии животных подвергали эвтаназии с помощью углекислого газа и вскрывали для изъятия легких и селезенки. Органы гомогенизировали в стерильных ступках. Для определения концентрации колониеобразующих единиц микроорганизмов гомогенат высевали методом 10-кратных разведений в физиологическом растворе с 0,05% Твин-80 на плотную питательную среду Middlebrook 7H11, содержащую 20% сыворотки крупного рогатого скота. Для подавления посторонней микрофлоры (при высевах из исходного разведения гомогената) в суспензию добавляли соляную кислоту до концентрации 3%. На поверхность среды в чашке Петри наносили 0,1 мл суспензии соответствующего разведения и тщательно растирали шпателем. Засеянные чашки помещали в полиэтиленовые пакеты и герметизировали. Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 25 суток, затем подсчитывали выросшие колонии. Подтверждение специфичности выросших колоний микобактерий осуществляли с помощью окрашивания по Цилю-Нильсону и световой микроскопии.

#### **2.10.5 Обработка экспериментальных данных**

На основании полученных данных был оценен антибактериальный эффект инъекционной формы препарата в сравнении с субстанцией. О нем судили по количеству КОЕ микобактерий, образовавшихся при высевах на чашки Петри гомогената тканей легких и селезенки после лечения животных. Достоверность различий между опытными группами и контрольной группой определяли,

используя критерий Стьюдента или, в случае сомнений относительно принадлежности выборки нормальному типу распределения, ранговый критерий Манна-Уитни, ориентируясь на уровень значимости, равный 0,05 [115].

## **2.11 Токсикологическое исследование водосовместимой формы рифапентина**

Исследование было выполнено в лаборатории фармакологии и химиотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), зав. лабораторией – к.м.н. Трещалин И.Д.

Эксперименты на животных выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [119]. Животные содержались в стандартных условиях, получая корм и воду *ad libitum*.

Исследование было выполнено в соответствии с требованиями действующего Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств и Правил лабораторной практики в Российской Федерации [120, 121].

### **2.11.1 Получение экспериментального препарата**

Для получения водосовместимой формы рифапентина использовался метод ультразвуковой гомогенизации, описанный в п. 2.4. Для исследования острой токсичности препарат получали, используя загрузку рифапентина 700 мг на 50 мл на одну серию, а для хронического эксперимента – 400 мг на 50 мл. Препарат характеризовали таким же образом, как описано в п. 2.6.

### **2.11.2 Изучение острой токсичности**

Исследование острой токсичности было проведено на мышах самках  $B_6D_2F_1$ , массой тела 18-22 г, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России.

Перед введением лиофилизат растворяли в воде для инъекций, субстанцию рифапентина диспергировали в 1 м/о% крахмальном клейстере. Препараты использовали в течение 24 ч.

Животные были разделены на группы по 6 особей. Коллоидную форму вводили однократно в хвостовую вену в диапазоне доз от 100 до 500 мг/кг, субстанцию вводили с помощью зонда в желудок в диапазоне доз от 4000 до 14000 мг/кг.

За животными наблюдали в течение 1 месяца после последнего случая гибели животного. Учитывали долю павших мышей в каждой группе.

Дозы, характеризующие токсичность субстанции и водосовместимой формы рифапентина, рассчитывали по методу Литчфилда и Уилкоксона [122] при помощи компьютерной программы StatPlus 2006.

### **2.11.3 Изучение хронической токсичности**

Исследование было проведено на беспородных крысах самцах, массой 170-190 г, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. После двухнедельного карантина животные были разделены на 6 групп по 10 голов в каждой.

Был выбран режим 15-кратного ежедневного введения в дозах, суммарно составляющих максимально переносимую дозу (МПД) и ЛД<sub>50</sub>.

МПД и ЛД<sub>50</sub> растворимой лекарственной формы для крыс были рассчитаны, исходя из результатов исследования острой токсичности на мышах, с использованием метаболических коэффициентов пересчета [123].

Поскольку при изучении острой токсичности субстанции гибели мышей достигнуть не удалось, усредненные значения ЛД<sub>50</sub> и МПД для крыс были взяты из имеющихся данных литературы [124, 125].

Воздействия, которым были подвергнуты животные каждой из групп, отражены в Табл. 5. Дизайн эксперимента представлен в Табл. 6.

Таблица 5. Характеристика экспериментальных групп

Номер группы	Количество животных	Препарат	Разовая доза активного вещества, мг/кг	Введение препарата	День эвтаназии
1	10	ЧСА-Рпт	9,27 (1/15 МПД)	Ежедневное интраперитонеальное введение 1 раз в сутки в течение 15 суток	16 и 30 сутки эксперимента
2	10	ЧСА-Рпт	11,53 (1/15 ЛД <sub>50</sub> )		
3	10	Рпт	83,33 (1/15 МПД)	Ежедневное пероральное введение 1 раз в сутки в течение 15 суток	
4	10	Рпт	166,67 (1/15 ЛД <sub>50</sub> )		
5	10	Плацебо ЧСА	Эквивалентно вводимому объему группы № 2		
6	10	-	-	Интактный контроль	

*Введение препарата.* Введение осуществлялось ежедневно в течение 15 суток в разовых дозах, соответствующих 1/15 ЛД<sub>50</sub> и 1/15 МПД. Субстанцию рифапентина вводили перорально, коллоидную форму – внутрибрюшинно. Разовые дозы растворимой лекарственной формы составляли 11,53 мг/кг и 9,27 мг/кг, разовые дозы субстанции равнялись 166,67 и 83,33 мг/кг. Лиофилизат препарата растворяли в воде для инъекций, субстанцию диспергировали в 1% крахмальном клейстере. Приготовление доз для введения осуществлялось в день введения.

*Взвешивание.* Массу тела животных определяли каждые 5 дней.

*Гематологическое исследование периферической крови.* Клинический анализ крови (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы, гранулоциты, эритроциты, гемоглобин, лейкоформула, гематокрит и тромбоциты) производился на 0, 7 и 15-е сутки во время курса и на 3, 5, 7, 10 и 15-е сутки после окончания курса. Для определения указанных показателей кровь у крыс брали из хвостовой вены.

*Биохимическое исследование сыворотки крови.* Процедура осуществлялась на 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений. В сыворотке крови определяли следующие показатели: аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), альбумин, билирубин (прямой и общий), креатинин, мочевины, общий белок, щелочная фосфатаза (ЩФ), глюкоза.

Таблица 6. Дизайн исследования

Показатель	Сутки опыта																																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16 (1 п.к.)	18 (3 п.к.)	20 (5 п.к.)	22 (7 п.к.)	25 (10 п.к.)	30 (15 п.к.)													
Взвешивание	*																																	
Введение препарата																																		
Клинический осмотр																																		
Электрокардиография																																		
Суточный диурез и клинический анализ мочи																																		
Клинический анализ крови																																		
Биохимический анализ крови																																		
Эвтаназия животных, вскрытие, определение массовых коэффициентов внутренних органов, патоморфологическое исследование																																		

\*Закрашенные ячейки показывают, в какие дни выполнялись данные процедуры.

*Исследование мочи.* Процедура осуществлялась на 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений. Определяли суточный диурез (выпито воды – выделено мочи) и производили клинический анализ мочи (эритроциты, лейкоциты, билирубин, уробилиноген, кетоновые тельца, глюкоза, рН, белок, нитраты, удельный вес).

*Электрокардиография.* ЭКГ во втором стандартном отведении регистрировали на 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений. Определяли величину интервалов R-R и QT, долю интервала QT и частоту сердечных сокращений.

*Патоморфологическое исследование.* На 1-е и 15-е сутки после окончания курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии, тщательно обследовали на предмет внешних патологических признаков, вскрывали, макроскопически оценивали состояние грудной и брюшной полости и внутренних органов, места введения исследуемых препаратов.

Сердце, печень, почки, тимус и селезенку взвешивали и определяли их массовые коэффициенты.

Патоморфологическому исследованию подвергали сердце, печень, почки, легкие, желудок, все отделы кишечника, поджелудочную железу, селезенку, тимус, лимфатические узлы, надпочечники, щитовидную железу, семенники, мочевой пузырь.

Участки внутренних органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

*Обработка экспериментальных данных.* Полученные количественные данные обрабатывали статистически при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия  $t$  Фишера-Стьюдента. Различия определяли как достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Разработка методов количественного определения рифапентина и рифаксими́на в водосовместимых лекарственных формах

Поскольку парентеральные формы рифапентина и рифаксими́на отсутствуют, требовалось разработать метод их количественного определения на фоне вспомогательных веществ, в первую очередь, белков, используемых в качестве солюбилизаторов данных плохо растворимых в воде антибиотиков.

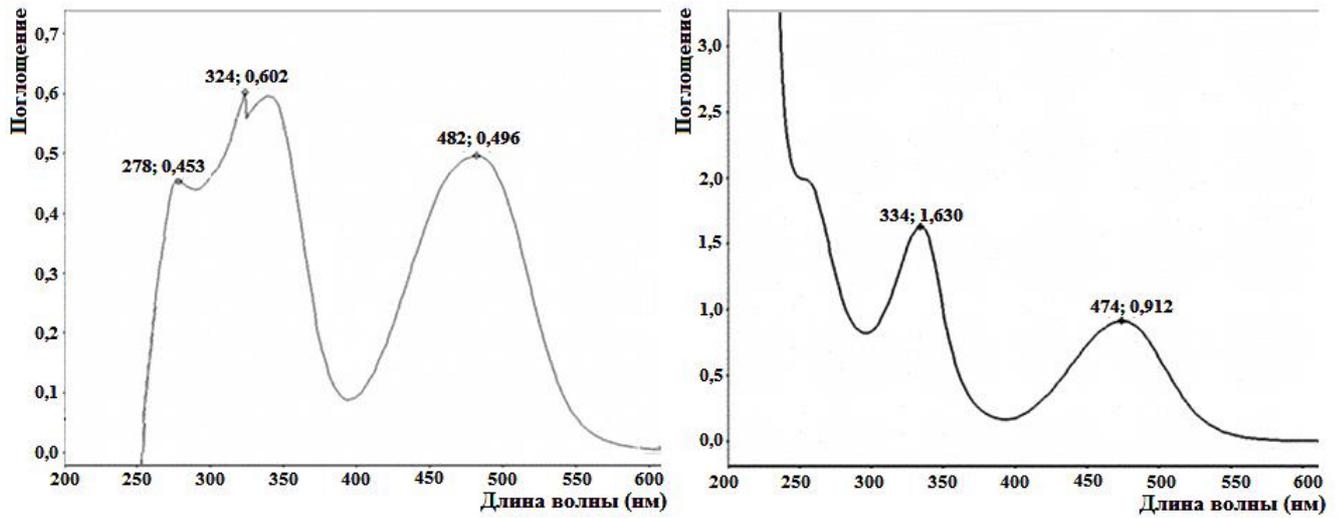
Спектрофотометрическое исследование показало, что для рифапентина характерно несколько пиков поглощения (Рис. 4), среди которых были выбраны пики в видимой области ( $\lambda = 482$  нм в ДМСО и  $\lambda = 474$  нм в воде), чтобы исключить влияние органических растворителей и вспомогательных веществ. Калибровочная зависимость сохраняла линейность при концентрациях рифапентина до 50 мкг/мл.

Спектры растворов рифаксими́на (Рис. 5) во многом оказывались схожими со спектрами рифапентина, так как рифапентин и рифаксими́н близки по химической структуре (см. Рис. 1). Для калибровки также были выбраны пики поглощения в видимой области ( $\lambda = 459$  нм в ДМСО и  $\lambda = 438$  нм в воде). Интенсивность поглощения рифаксими́на была несколько ниже, по сравнению с рифапенти́ном. Калибровочная зависимость сохраняла линейность при концентрациях рифаксими́на до 62,5 мкг/мл.

Каждую калибровку выполняли в трех повторностях. Данные считали удовлетворительными, если коэффициент детерминации прямой ( $R^2$ ) оказывался не меньше, чем 0,95. Экспериментальные данные представлены в Табл. 7.

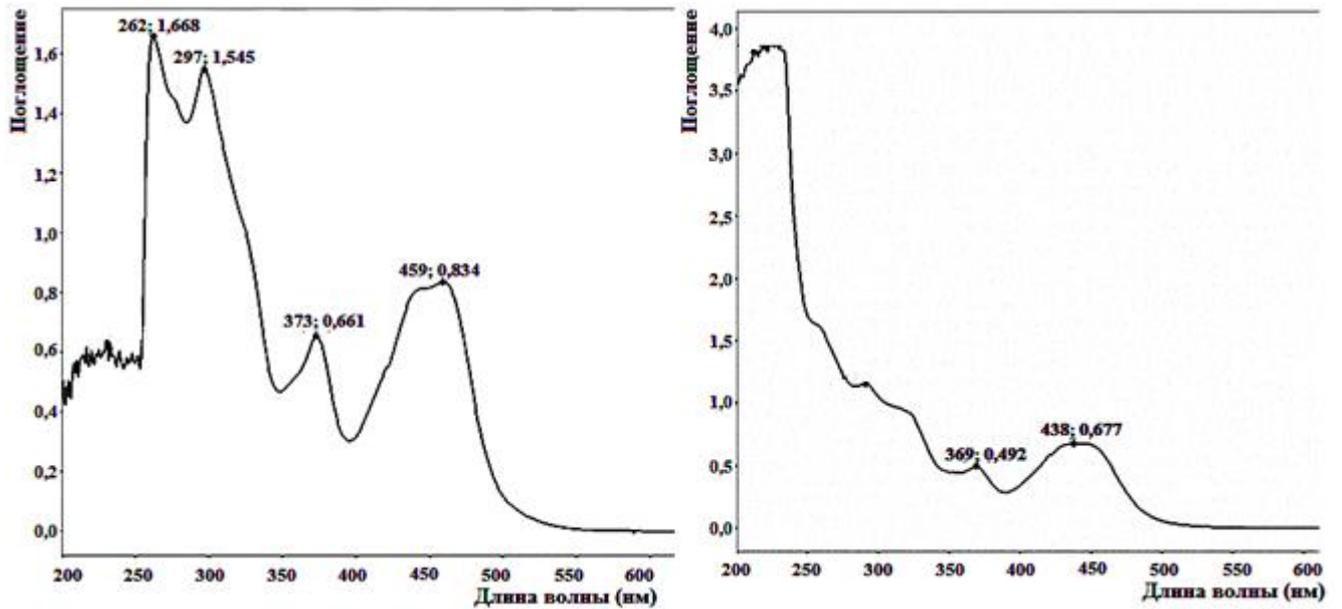
Было отмечено, что добавление человеческого сывороточного альбумина к раствору рифапентина не оказывает влияния на пик, по которому строилась калибровка, вызывая лишь изменения в ультрафиолетовой части спектра (Рис. 6). Сукцини́лированный желатин и казеинат натрия также не оказывают влияния на пик рифапентина и рифаксими́на в видимой области (данные

не приводятся). Таким образом, белки не препятствуют количественному определению рифапентина и рифаксимины.



слева – в ДМСО (30 мкг/мл РпТ); справа – в воде (50 мкг/мл РпТ)

Рисунок 4. Спектры поглощения растворов рифапентина



слева – в ДМСО (50 мкг/мл Рфс); справа – в воде (50 мкг/мл Рфс)

Рисунок 5. Спектры поглощения растворов рифаксимины

Таблица 7. Калибровочные зависимости оптической плотности от концентрации растворов рифапентина и рифаксимина

Соединение	Растворитель	Длина волны $\lambda$ , нм	Уравнение калибровки A(c)
Рифапентин	ДМСО	482	$A = 0,0193 \times c$ $R^2 = 0,999157$ $c = 5 \div 50$ мкг/мл
	Вода	474	$A = 0,0198 \times c$ $R^2 = 0,999511$ $c = 5 \div 50$ мкг/мл
Рифаксимин	ДМСО	459	$A = 0,0178 \times c$ $R^2 = 0,998307$ $c = 5 \div 62,5$ мкг/мл
	Вода	438	$A = 0,0147 \times c$ $R^2 = 0,999404$ $c = 5 \div 62,5$ мкг/мл

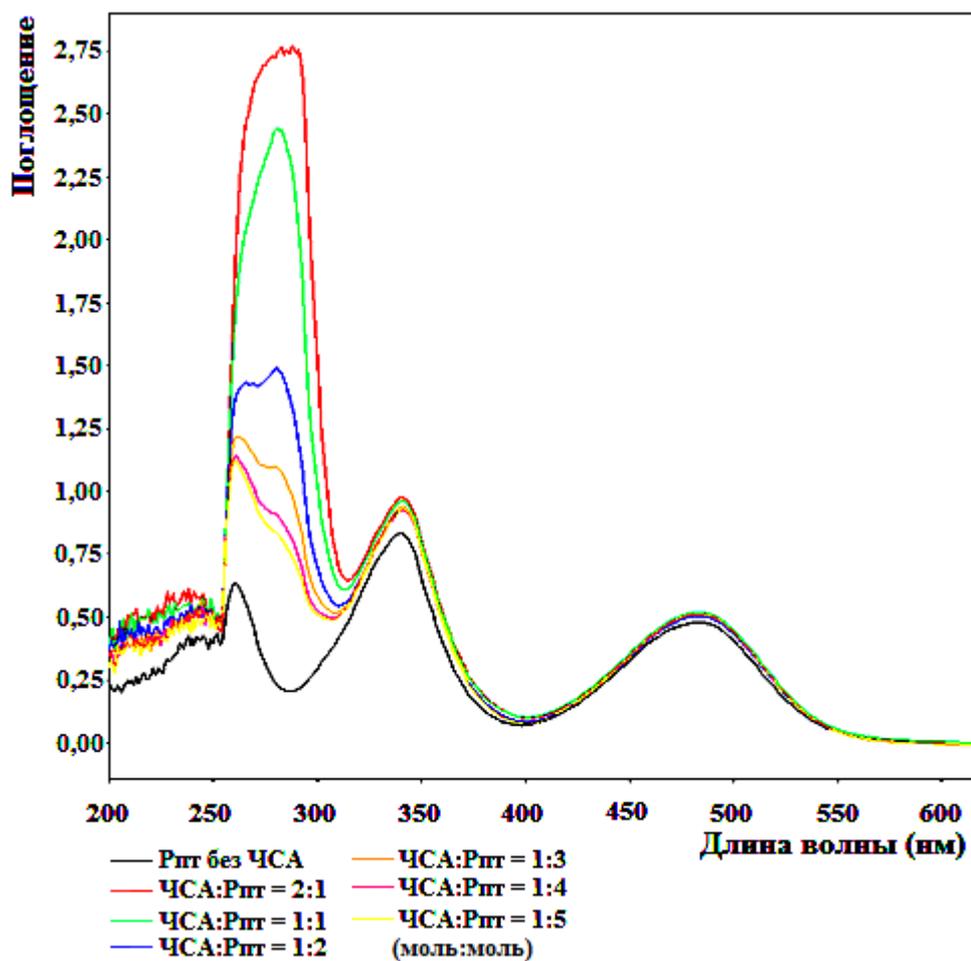


Рисунок 6. Влияние человеческого сывороточного альбумина на спектры поглощения растворов рифапентина

### 3.2 Определение растворимости рифапентина и рифаксими́на

Перед разработкой технологии получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на предварительно оценивали растворимость в воде их субстанций и влияние на нее вспомогательных веществ.

Растворимость – одна из ключевых характеристик лекарственного вещества, влияющая как на его биологические свойства, так и на возможные методы получения лекарственной формы данной субстанции. В 1995 г. была разработана система биофармацевтической классификации (BCS) лекарственных веществ [126]. В ее основе лежат характеристики, главным образом определяющие биораспределение лекарственного вещества при пероральном приеме: растворимость и кишечная проницаемость. Антибиотики, исследуемые в данной работе, рифапентин и рифаксимин, принадлежат классам II (низкая растворимость и высокая проницаемость) и IV (низкая растворимость и низкая проницаемость), соответственно [127-129]. В связи с этим применяются различные методы повышения истинной и коллоидной растворимости, рассмотренные в п. 1.4. Целью данного исследования являлась разработка водосовместимых, основанных на применении белков, форм рифапентина и рифаксими́на, обладающих повышенной растворимостью и биодоступностью данных антибиотиков.

Растворимость различают термодинамическую и кинетическую. Последняя чаще изучается на ранних стадиях фармразработки с участием новых субстанций при необходимости проведения большого количества анализов. Методика заключается в приготовлении последовательных разбавлений исходного органического раствора испытуемого вещества в среде растворения с регистрацией мутности полученных проб или проведением в них количественного определения спектрофотометрически или хроматографически. Очевидно, что при использовании этого метода значения растворимости оказываются несколько завышенными из-за некоторого количества органического растворителя, остающегося в конечном растворе. Кроме того, в таком случае не учитывается кристаллическое состояние исходной субстанции.

В данном исследовании изучалась термодинамическая растворимость с использованием «метода встряхиваемой колбы», предложенного Хигучи и Коннорсом (1965 г.), как наиболее широко используемого для труднорастворимых соединений. Он заключается в добавлении заведомо избыточного количества исследуемого соединения в среду растворения, так, чтобы образовался насыщенный раствор, – после чего на следующие сутки отделяют супернатант и в нем осуществляют количественное определение. Следует помнить, что и в данном случае значение растворимости условное, так как его достижение ограничивается временем эксперимента, а не временем достижения термодинамического равновесия [130].

Предварительно была определена растворимость субстанций в воде. Растворимость рифапентина составила  $0,108 \pm 0,006$  мг/мл ( $P = 0,05$ ;  $n = 10$ ), растворимость рифаксимины составила  $0,00271 \pm 0,00041$  ( $P = 0,05$ ;  $n = 10$ ), то есть практически на 2 порядка ниже. При этом теоретически рассчитанные значения растворимости, указанные в справочнике, составляют 0,0213 мг/мл для рифапентина и 0,00738 мг/мл для рифаксимины [131, 132]. Следует, однако, учитывать, что экспериментальные данные по растворимости зависят также от времени эксперимента, кристалличности данного образца субстанции, качества очищенной воды. Например, в исследовании [93] растворимость рифапентина, определенная аналогичным образом (инкубация при 37 °С, охлаждение, отделение осадка и определение концентрации в растворе) оказалась равной 0,62 мг/мл.

Аналогично была определена растворимость рифапентина в присутствии вспомогательных веществ, а также в условиях, соответствующих условиям получения лекарственных форм (см. п. 2.3, Табл. 2). Перед разработкой технологии было изучено влияние каждого фактора (состав водной фазы, ультразвуковая обработка) на растворимость рифапентина. Полученные данные представлены в Табл. 8.

Таблица 8. Влияние вспомогательных веществ и обработки субстанции на растворимость рифапентина в воде

№№	Условия	Растворимость*, мг/мл
1	Вода	0,108 ± 0,006
2	3 м/о% ЧСА	0,263 ± 0,002
3	5 м/о% маннит	0,096 ± 0,001
4	3 м/о% ЧСА и 5 м/о% маннит	0,254 ± 0,004
5	1 м/о% СЖ	0,137 ± 0,001
6	1 м/о% КН	0,141 ± 0,001
7	Вода, ультразвук	0,183 ± 0,004
8	Вода (Рпт из дихлорметана), ультразвук	0,127 ± 0,002
9	Вода, высаживание из ацетона	0,370 ± 0,014
10	1 м/о% PF68	0,058 ± 0,001
11	2 м/о% PF68	0,068 ± 0,001
12	1 м/о% PF68, ультразвук	0,059 ± 0,003
13	2 м/о% PF68, ультразвук	0,068 ± 0,001
14	1 м/о% PF68 (Рпт из дихлорметана), ультразвук	0,046 ± 0,002
15	2 м/о% PF68 (Рпт из дихлорметана), ультразвук	0,050 ± 0,001
16	1 м/о% PF68, высаживание из ацетона	0,101 ± 0,004
17	2 м/о% PF68, высаживание из ацетона	0,111 ± 0,005

\* Во всех случаях: P = 0,05; n = 10.

*Влияние человеческого сывороточного альбумина, сукцинированного желатина, казеината натрия и маннита.* Как было сказано выше, экспериментально определенная растворимость субстанции рифапентина в воде оказалась равной приблизительно 0,1 мг/мл.

Добавление в воду человеческого сывороточного альбумина существенно повысило растворимость рифапентина в воде. В то же время эффект от добавления сукцинированного желатина и казеината натрия был статистически значимым, но не столь существенным. Так, достигнутая величина растворимости рифапентина в 3%\* ЧСА (0,263 мг/мл) была в 2,44 раза выше, чем в воде, в то время как в 1% СЖ и 1% КН она превысила исходную только в 1,27 и 1,31 раза (0,137 и 0,141 мг/мл, соответственно).

\* Здесь и далее в отношении вспомогательных веществ вместо обозначения «м/о%» приводится обозначение «%» с целью сокращения.

Маннит же (5%) не оказал влияния на растворимость рифапентина ни сам по себе, ни в сочетании с 3% ЧСА. Напротив, растворимость рифапентина оказалась

даже несколько меньшей в присутствии маннита. Можно полагать, что причиной тому служит явление, аналогичное эффекту высаливания. Известно, что неэлектролиты также способны выступать в качестве «высаливающих» веществ. В частности, такими свойствами обладают сахароза и сорбит; по-видимому, маннит также оказывает подобное действие [133, 134].

*Влияние ультразвуковой обработки и процесса высаливания субстанции из органического растворителя.* Ультразвуковая гомогенизация суспензии субстанции рифапентина в воде повысила ее растворимость в 1,69 раза по сравнению с исходной. Это наблюдение согласуется с явлением увеличения скорости растворения и кажущейся растворимости в результате уменьшения размеров частиц, описываемых в рамках уравнений Нойеса-Уитни и Гиббса-Кельвина [135]. При этом в случае предварительного растворения субстанции в дихлорметане эффект оказывается гораздо меньшим (растворимость возростала всего в 1,18 раза). Видимо, последнее связано с уменьшением площади контакта рифапентина с водой из-за нахождения большей его части в каплях дихлорметана.

Высаливание субстанции из ацетона в воду оказалось наиболее эффективным методом повышения ее растворимости (возрастает в 3,43 раза). Следует, однако, допускать, что в растворе могло быть остаточное количество ацетона, вызвавшее некоторое завышение растворимости рифапентина. Интересно то, что в этом случае избыток рифапентина не выпадал в осадок, а, напротив, стремился к поверхности; частицы имели продолговатую, перистую форму, что говорит об изменении модификации состояния субстанции. Полученная при этом взвесь оказывалась достаточно стабильной: при хранении в течение суток при 4 °С количество осадка не увеличивалось, и значения концентрации рифапентина также сохранялись постоянными.

*Влияние Pluronic® F-68.* В результате использования Pluronic® F-68 растворимость рифапентина, оказывалась в 1,5-2 раза ниже исходного значения. Очевидно, причиной тому является образование мицелл, так же, как и в случае определения растворимости рифапентина в присутствии казеината натрия. Однако в данном случае практически не наблюдалось отделения осадка, а

образовывалась однородная суспензия. Кроме солюбилизации, можно также предположить образование наночастиц субстанции, которые оказываются стабилизированными молекулами PF68, окружающими их. В этом случае агрегаты осаждаются в результате центрифугирования и в супернатанте остается только свободный рифапентин, которого оказывается меньше, чем при отсутствии PF68.

Ультразвуковая гомогенизация суспензии в присутствии PF68 практически не повлияла на полученные значения растворимости. Предварительное растворение рифапентина в дихлорметане также уменьшало полученные значения, как это было и в эксперименте без PF68, но не столь существенно.

В случае высаживания рифапентина из ацетона были получены наибольшие значения содержания его в растворе. Такие суспензии сохраняли свою однородность в течение нескольких часов при комнатной температуре и в холодильнике.

Эксперименты с PF68 заслуживают особого внимания. Коллоидные системы, полученные с его участием, в наибольшей степени оказывались схожими с теми, что характерны для водосовместимой формы рифапентина на основе белков (см. следующий раздел). Несмотря на то, что в водной фазе оказывалось меньше рифапентина, чем в насыщенном растворе без PF68, его общее содержание в суспензии гораздо выше. Поэтому в таком случае имеет смысл не определять растворимость, а оценивать общее содержание рифапентина и учитывать размеры частиц в суспензии, как это делали впоследствии для его водосовместимой формы. Данная технология с использованием Pluronic® F-68 была отмечена как возможная альтернатива использованию белков.

В результате выполненной работы было установлено следующее:

- Экспериментально определенная растворимость рифапентина и рифаксимины составила 0,108 и 0,00271 мг/мл.
- Присутствие белков человеческого сывороточного альбумина, сукцинированного желатина и казеината натрия повышает водную растворимость рифапентина до 0,263, 0,137 и 0,141 мг/мл, соответственно.

- В результате ультразвуковой обработки взвеси субстанции рифапентина в воде растворимость возрастает до 0,183 мг/мл.
- Поллоксамер Pluronic<sup>®</sup> F-68 повышает коллоидную растворимость рифапентина, однако истинная растворимость снижается до 0,058 мг/мл.

### 3.3 Получение водосовместимой формы рифапентина и рифаксими́на

Рифапентин был получен в 1970-е гг. и запатентован в США в 1977 г. Субстанция представляет собой смесь нескольких твердых форм основания рифапентина, различных по стабильности, биодоступности и технологическим свойствам. С тех пор предпринимались попытки модификации субстанции. Они заключались, например, в создании солей рифапентина с минеральными кислотами (гидрохлоридов и гидробромидов) и получении определенных его кристаллических форм. При этом отмечали повышение растворимости в воде и говорили о возможности парентерального введения. Однако целью было не столько решение проблемы низкой растворимости рифапентина в воде, сколько устранение расхождений между различными партиями субстанции, обусловленных разнообразием полиморфных форм [136, 137].

Выше отмечалось (п. 1.4), что применение методов твердой дисперсии и получение комплексов включения позволили повысить скорость растворения, смачиваемость и растворимость рифапентина [93-96].

Тем не менее, до сих пор рифапентин выпускается только в виде таблеток и капсул, например, Priftin<sup>®</sup>, Рифапекс<sup>®</sup>, что, видимо, связано не только с его низкой растворимостью в воде, но и достаточно высокой биодоступностью (70%) [128].

Рифаксимин же не только обладает крайне низкой растворимостью в воде, но и практически не всасывается из желудочно-кишечного тракта [129]. Поэтому он используется только в лечении желудочно-кишечных инфекций и не применяется, в частности, против туберкулеза, как остальные рифамицины (рифампицин, рифабутин, рифапентин). Создание парентеральной формы рифаксими́на позволило бы, таким образом, расширить область его применения. Имеются сведения об успешном получении полимерных наночастиц с высоким

содержанием рифаксими́на, в результате чего возрастала его растворимость и уменьшалось побочное действие. Однако данный состав был рассчитан на пероральное применение, так как основной задачей являлось контролируемое высвобождение рифаксими́на в среде кишечника [138, 139].

Для получения водосовместимых форм вначале в качестве солюбилизатора использовали ЧСА, основываясь на успехе данной технологии в разработке коллоидных форм паклитаксела и рифабутина [104-110]. Применимость данного подхода также была далее оценена на примере сукцинилизированного желатина и казеината натрия.

Альбумин, желатин и казеин широко используются в медицине и фармацевтической технологии.

ЧСА, основной белок плазмы крови, является универсальным переносчиком как эндогенных, так и экзогенных веществ. Он используется для лечения шока, ожогов, в качестве плазмозаменителя и пр. [140, 141]. Известно, что было описано взаимодействие некоторых рифамицинов с ЧСА. Так, для рифамицина SV, исходного соединения, из которого получили рифампицин и рифапентин, константа связывания с ЧСА составляет  $\sim 10^6$  л/моль, при этом стехиометрия комплекса приблизительно равна 1:1, что говорит о сильном взаимодействии белка и антибиотика [142, 143].

Желатин (частично гидролизированный коллаген, в аминокислотной последовательности которого преобладают глицин, пролин и оксипролин) также обладает некоторыми эмульгирующими свойствами [102, 144]. Сукцинилизированный желатин, менее вязкий по сравнению с исходным желатином, используют в качестве плазмозаменителя [145]. Наличие в его молекулах сукцинильного остатка приводит к появлению дополнительного отрицательного заряда, что в том числе может способствовать стабилизации суспензии рифапентина.

Казеин (входящий в состав коровьего молока сложный белок из группы фосфопротеидов) используют как стабилизатор пищевых и лекарственных эмульсий. Казеинат натрия – натриевая соль смеси различных казеинов ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,

$\beta$ - и  $\kappa$ -), лучше растворимая в воде, чем сам казеин. Молекула казеина обладает ярко выраженными амфифильными свойствами, что способствует образованию мицелл, дополнительно стабилизированных фосфатными группами и вкраплениями фосфата кальция [146]. Описана мицеллярная форма противоопухолевого препарата митоксантрона на основе казеина. Подобная мицелла состояла из 15-60 молекул казеина и вмещала в себя 90-360 молекул митоксантрона [147].

В разработке водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины были использованы методы наноосаждения и гомогенизации – основные методы, применяемые в фармацевтической технологии для получения нанодисперсий в жидкой среде [148]. В обоих случаях субстанцию, плохо растворяющуюся в воде, растворяют в подходящем легколетучем органическом растворителе и объединяют полученный раствор с водной фазой: как правило, водным раствором поверхностно-активного вещества. Принципиальная разница между этими методами заключается в природе использованного для растворения субстанции органического растворителя: смешивающегося, либо не смешивающегося с водой. Метод гомогенизации основан на получении однородной эмульсии и далее, после испарения органического, не смешивающегося с водой растворителя, однородной суспензии труднорастворимого в воде соединения. Напротив, метод наноосаждения основан на использовании для растворения субстанции растворителя, хорошо смешивающегося с водой. В последнем случае при объединении растворов происходит замена «хорошего» для субстанции растворителя на «плохой», что и приводит к образованию суспензии – происходит процесс высаживания субстанции. Правильно сформулированные параметры процесса позволяют получить устойчивую суспензию субстанции, в зависимости от задачи исследования – пригодную либо для внутривенного введения, либо для перорального, но с увеличенной, за счет повышения растворимости и/или проницаемости, биодоступностью. Схематическое изображение рассматриваемых процессов представлено на Рис. 7.

Выбор технологии получения лекарственной формы был проведен с использованием в качестве солюбилизатора человеческого сывороточного альбумина. Далее найденные условия применяли при получении лекарственных форм, основанных на использовании в качестве солюбилизатора сукцинированного желатина и казеината натрия.

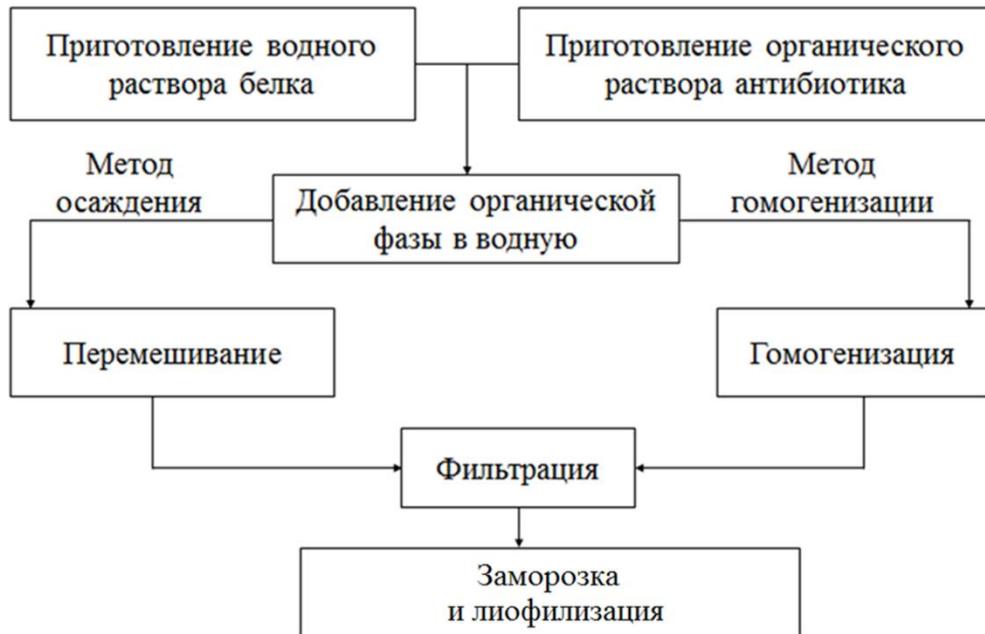


Рисунок 7. Блок-схема лабораторной технологии получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на на основе белков

### 3.3.1 Водосовместимая форма рифапентина

*Метод наноосаждения.* При разработке методики использовали начальные условия, определенные в предварительных экспериментах: водный раствор содержал 3% ЧСА, соотношение объемов водного и органического растворов составляло 14:1. В качестве растворителя для рифапентина использовали ацетон, ацетонитрил либо этанол – хорошо смешивающиеся с водой растворители. В ходе работы исследовали влияние на основные характеристики готовой формы следующих параметров:

- исходная загрузка по рифапентину;
- отношение объемов органический раствор рифапентина : раствор ЧСА;
- скорость перемешивания;

- время перемешивания.

В качестве контролируемых характеристик получаемой формы использовали следующие:

- внешний вид и ресуспендируемость лиофилизата;
- устойчивость суспензии;
- размеры частиц в суспензии и распределение их по размерам;
- общее содержание рифапентина в суспензии;
- концентрация рифапентина в водной фазе суспензии.

Подробные условия экспериментов приведены в Табл. 9, а характеристики полученных образцов – в Табл. 10. Из представленных данных следует, что важнейшими параметрами процесса получения водосовместимой лекарственной формы рифапентина данным методом, являются природа растворителя и общее исходное количество рифапентина (его загрузка). Наилучшие результаты удалось получить, используя в качестве растворителя для рифапентина ацетон либо ацетонитрил; ориентировочная растворимость его в данных растворителях составляет 10 и 20 мг/мл, соответственно. Наименьшее общее содержание рифапентина было тех в суспензиях, которые были получены с использованием этанола, в котором растворимость рифапентина не превышала 5 мг/мл, причем в ряде случаев полученную суспензию не удалось лиофилизировать удовлетворительно (лиофилизаты не удалось ресуспендировать). Кроме того, для получения максимальных значений содержания рифапентина в готовой суспензии требуется исходить из общего содержания его в органическом растворителе, равном или превышающем его растворимость с последним. Изменения скорость перемешивания в пределах  $450 \pm 100$  об/мин практически не повлияли на свойства получаемых образцов, а увеличение доли органического растворителя привело к ухудшению ресуспендируемости лиофилизатов.

Таким образом, наилучшие образцы, полученные методом наноосаждения, имели следующие характеристики: общее содержание рифапентина – 1,35 мг/мл из возможных 1,6 мг/мл, содержание рифапентина в водной фазе – 0,746 мг/мл, средний размер частиц около 595 нм, индекс полидисперсности – около 0,300,

образцы хорошо ресуспендировались. Образцы были получены с использованием в качестве растворителя для рифапентина ацетонитрила, растворимость рифапентина в котором максимальна (из исследованных растворителей).

Таблица 9. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом nanoосаждения

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рпт, мг	ω, об/мин	τ, ч	Крипротектор
1	3 м/о% ЧСА; 12,5 мл	EtOH; 0,9 мл	14:1	40	450	3	1 м/о% маннит
2		Me <sub>2</sub> CO; 0,9 мл	14:1	40	450	3	
3		АЦН; 0,9 мл	14:1	20	450	3	
4		EtOH; 0,9 мл	14:1	5	450	3	
5		Me <sub>2</sub> CO; 0,9 мл	14:1	10	450	3	
6		АЦН; 1,8 мл	7:1	40	450	3	
7		АЦН; 0,9 мл	14:1	20	350	3	
8		АЦН; 0,9 мл	14:1	20	450	3	
9		АЦН; 0,9 мл	14:1	20	550	3	

W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рпт – нагрузка рифапентина;  
ω – скорость перемешивания; τ – время перемешивания

Таблица 10. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом nanoосаждения

№№	С <sub>общ.</sub> *, МГ/МЛ	С <sub>вод.</sub> *, МГ/МЛ	η *, масс. %	d <sub>z</sub> **, нм	I <sub>p</sub> **
1	2,31	0,668	72,19	779 ± 88	0,916 ± 0,074
2	2,13	0,723	66,56	857 ± 73	0,829 ± 0,077
3	1,04	0,655	65,00	564 ± 14	0,430 ± 0,021
4	0,29	0,292	73,00	11 ± 2	0,514 ± 0,012
5	0,55	0,497	68,13	129 ± 58	0,508 ± 0,051
6	2,39	0,588	74,69	1173 ± 11	0,521 ± 0,050
7	1,35	0,746	84,38	595 ± 10	0,300 ± 0,029
8	1,21	0,678	75,63	659 ± 10	0,423 ± 0,016
9	1,17	0,768	73,13	663 ± 13	0,407 ± 0,008

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
\*\* Приводится  $\bar{X} \pm S$  по 4 измерениям.  
Красным выделены образцы, которые не ресуспендируются, зеленым – наилучшие образцы.  
С<sub>общ.</sub> – общее содержание антибиотика; С<sub>вод.</sub> – содержание антибиотика в водной фазе; η – выход по антибиотику от теоретического значения; d<sub>z</sub> – средний диаметр частиц; I<sub>p</sub> – индекс полидисперсности

*Метод гомогенизации с помощью высокоскоростного диспергатора.* Здесь и при использовании других методов гомогенизации в составе органической фазы использовался дихлорметан, растворимость рифапентина в котором значительно выше (более 200 мг/мл), чем в растворителях, используемых в методе nanoосаждения. Условия диспергирования во всех случаях были одни и те же (24000 об/мин; 2 мин).

Подробные условия экспериментов приведены в Табл. 11, а характеристики полученных образцов – в Табл. 12. Из представленных данных хорошо видно, что в принципе данным способом удается получить образцы с весьма высоким, вплоть до 10,5 мг/мл, общим содержанием рифапентина в суспензии и концентрацией его в водной фазе, превышающей 0,8 мг/мл. Однако очевидно, что он не позволяет обеспечить достаточную мощность гомогенизации, что выражается в устойчивости получаемой суспензии. Размеры частиц суспензии в большинстве случаев превышают 1 мкм. Только понижение исходной концентрации рифапентина в дихлорметане до 55,6 мг/мл (вчетверо меньше его растворимости в данном растворителе) позволило получить ресуспендируемый лиофилизат частиц субмикронного размера. Характеристики полученной формы таковы: общее содержание рифапентина – 3,5 мг/мл, содержание рифапентина в водной фазе – 0,8 мг/мл, средний размер частиц около 883 нм, индекс полидисперсности – около 0,59, образцы хорошо ресуспендировались. В то же время по содержанию рифапентина образцы, полученные данным методом, превосходят образцы, полученные методом nanoосаждения.

Интересно, что использование в составе водной фазы 2% Pluronic® F-68 наряду с ЧСА привело к существенному укрупнению частиц и к уменьшению как общего его содержания в суспензии, так и концентрации в водной фазе. Вероятно, это ПАВ препятствует взаимодействию между белком и антибиотиком.

Таблица 11. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом диспергирования

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рпт, мг	ω, об/мин	τ, мин	Криопротектор		
1	3 м/о% ЧСА; 12,5 мл	ДХМ; 0,9 мл	14:1	50	24000	2	1 м/о% маннит		
2			14:1	100	24000	2			
3			14:1	200	24000	2			
4			14:1	80	24000	2			
5					14:1	80	24000	2	3 м/о% маннит
6					14:1	80	24000	2	5 м/о% маннит
7*					14:1	80	24000	2	
8**					14:1	80	24000	2	
* Водная фаза дополнительно содержала 1 м/о% PF68. ** Водная фаза дополнительно содержала 2 м/о% PF68. W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рпт – загрузка рифапентина; ω – скорость вращения лопастей диспергатора; τ – время диспергирования									

Таблица 12. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом диспергирования

№№	С <sub>общ.</sub> <sup>*</sup> , мг/мл	С <sub>вод.</sub> <sup>*</sup> , мг/мл	η <sup>*</sup> , масс. %	d <sub>z</sub> <sup>**</sup> , нм	I <sub>p</sub> <sup>**</sup>
1	3,50	0,803	87,50	883 ± 30	0,586 ± 0,027
2	5,68	0,815	71,00	1528 ± 47	0,606 ± 0,138
3	10,48	0,820	65,50	4557 ± 679	0,573 ± 0,029
4	5,01	0,963	78,28	2020 ± 86	0,590 ± 0,108
5	4,85	0,909	75,78	2510 ± 541	0,530 ± 0,037
6	4,94	0,884	77,19	2485 ± 192	0,529 ± 0,059
7	4,39	0,637	68,59	1828 ± 438	0,953 ± 0,034
8	4,05	0,667	63,28	12220 ± 421	0,960 ± 0,041

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
 \*\* Приводится  $\bar{X} \pm S$  по 4 измерениям.  
 Красным выделены образцы, которые не ресуспендируются, зеленым – наилучшие образцы.  
 С<sub>общ.</sub> – общее содержание антибиотика; С<sub>вод.</sub> – содержание антибиотика в водной фазе; η – выход по антибиотику от теоретического значения; d<sub>z</sub> – средний диаметр частиц; I<sub>p</sub> – индекс полидисперсности

*Метод гомогенизации высокого давления.* В данном случае, помимо диспергирования, вводится вторая, дополнительная стадия гомогенизации под высоким давлением.

Подробные условия экспериментов приведены в Табл. 13, а характеристики полученных образцов – в Табл. 14. Действительно, хорошо видно, что метод гомогенизации высокого давления обеспечил получение устойчивых суспензий частиц рифапентина сравнительно небольшого размера (около 200-300 нм) с наименьшим индексом полидисперсности: около 0,2-0,4. Использование практически тех же исходных концентраций рифапентина в дихлорметане (55,6, 111,1 и 222,2 мг/мл), что и в предыдущем методе, привело к понижению как общего содержания субстанции в суспензии, так и к понижению ее концентрации в водной фазе – очевидно, в связи с большими механическими потерями. Однако, в отличие от метода диспергирования, в данном методе полученные суспензии были устойчивы (за исключением образца с максимальной исходной концентрацией рифапентина в дихлорметане), а размер частиц в них не превышал 500 нм. Интересно также, что увеличение времени предварительного диспергирования (с 2 до 5 и 10 минут) также не позволяло улучшить качество получаемых образцов; напротив, это лишь укрупняло размеры частиц. Увеличение же содержания криопротектора (маннита) в суспензии с 1 до 3-5%,

способствовало повышению ее устойчивости. Это позволило получать образцы приемлемого качества с более высоким содержанием антибиотика при прочих равных условиях.

Таблица 13. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом гомогенизации высокого давления

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рпт, мг	Р <sub>r</sub> , psi	τ, мин	Криопротектор
1	3 м/о% ЧСА; 12,5 мл	ДХМ; 0,9 мл	14:1	50	12000	5	1 м/о% маннит
2			14:1	100	12000	5	
3			14:1	200	12000	5	
4*			14:1	80	12000	5	
5*			14:1	80	12000	5	
6*			14:1	80	12000	5	
7			14:1	100	12000	5	
8			14:1	100	12000	5	5 м/о% маннит
9			14:1	100	12000	5	3 м/о% маннит
10			14:1	150	12000	5	3 м/о% маннит
11			14:1	200	12000	5	3 м/о% маннит

\* В данном случае различалось только время предварительной гомогенизации на диспергаторе (2, 5 или 10 мин).  
W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рпт – загрузка рифапентина;  
Р<sub>r</sub> – давление гомогенизации; τ – время гомогенизации

Таблица 14. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом гомогенизации высокого давления

№№	С <sub>общ.</sub> <sup>*</sup> , мг/мл	С <sub>вод.</sub> <sup>*</sup> , мг/мл	η <sup>*</sup> , масс.%	d <sub>z</sub> <sup>**</sup> , нм	I <sub>p</sub> <sup>**</sup>
1	2,18	0,689	54,50	248 ± 1	0,275 ± 0,007
2	4,49	0,734	56,13	261 ± 3	0,252 ± 0,014
3	9,89	0,789	61,81	339 ± 2	0,287 ± 0,031
4	4,12	0,769	64,38	326 ± 6	0,368 ± 0,009
5	4,57	0,623	71,41	789 ± 61	0,480 ± 0,031
6	4,13	0,650	64,53	847 ± 16	0,481 ± 0,020
7	4,99	0,671	62,38	286 ± 6	0,247 ± 0,006
8	4,93	0,669	61,63	283 ± 3	0,219 ± 0,014
9	4,40	0,668	55,00	312 ± 5	0,261 ± 0,038
10	7,31	0,691	60,92	325 ± 3	0,243 ± 0,017
11	9,63	0,640	60,19	328 ± 6	0,266 ± 0,019

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
\*\* Приводится  $\bar{X} \pm S$  по 4 измерениям.  
Красным выделены образцы, которые не ресуспендируются, зеленым – наилучшие образцы.  
С<sub>общ.</sub> – общее содержание антибиотика; С<sub>вод.</sub> – содержание антибиотика в водной фазе; η – выход по антибиотику от теоретического значения; d<sub>z</sub> – средний диаметр частиц; I<sub>p</sub> – индекс полидисперсности

Таким образом, данный метод позволил получить образцы с общим содержанием рифапентина около 7 мг/мл и средним диаметром частиц около

300 нм. Также было отмечено, что гомогенизация высокого давления позволяет получить наиболее узкое распределение частиц по размерам (наименьший индекс полидисперсности) среди всех перечисленных ранее методов.

*Метод ультразвуковой гомогенизации.* В отличие от метода гомогенизации высокого давления, данная технология не предполагает использования сложного и весьма дорогого оборудования. Поэтому была предпринята попытка получить водосовместимую форму рифапентина с его помощью. В то же время по составу водной и органической фаз, а также по соотношению их объемов методы идентичны.

Подробные условия экспериментов приведены в Табл. 15, а характеристики полученных образцов – в Табл. 16. Можно видеть, что в целом тенденции, отмеченные в методе гомогенизации высокого давления, наблюдались и в данном случае. Повышение концентрации рифапентина в исходном растворе выше 55,6 мг/мл ухудшало устойчивость суспензии, а увеличение концентрации маннита в системе с 1 до 3 либо 5%, как и в остальных методах, позволило получать устойчивые суспензии с высоким содержанием рифапентина. Общее содержание антибиотика в таких суспензиях превышало 10 мг/мл при его концентрации в водной фазе около 0,7 мг/мл, а размер частиц составлял около 500 нм при весьма низком индексе полидисперсности – около 0,26.

Таблица 15. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом ультразвуковой гомогенизации

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рпт, мг	N, Вт	τ, мин	Криопротектор
1	3 м/о% ЧСА; 12,5 мл	ДХМ; 0,9 мл	14:1	50	70	6	1 м/о% маннит
2			14:1	100	70	6	1 м/о% маннит
3			14:1	200	70	6	1 м/о% маннит
4			14:1	200	70	6	3 м/о% маннит
5			14:1	200	70	6	5 м/о% маннит

W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рпт – загрузка рифапентина;  
N – мощность ультразвука; τ – время гомогенизации

Таблица 16. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом ультразвуковой гомогенизации

№№	$c_{\text{общ.}}^*$ , мг/мл	$c_{\text{вод.}}^*$ , мг/мл	$\eta^*$ , масс. %	$d_z^{**}$ , нм	$I_p^{**}$
1	2,97	0,662	74,25	575 ± 17	0,262 ± 0,007
2	5,22	0,594	65,25	558 ± 11	0,237 ± 0,012
3	10,97	0,604	68,56	548 ± 6	0,229 ± 0,033
4	10,14	0,711	63,38	519 ± 4	0,252 ± 0,025
5	10,23	0,700	63,94	435 ± 4	0,219 ± 0,029

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
 \*\* Приводится  $\bar{X} \pm S$  по 4 измерениям.  
 Красным выделены образцы, которые не ресуспендируются, зеленым – наилучшие образцы.  
 $c_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $c_{\text{вод.}}$  – содержание антибиотика в водной фазе;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

- При применении метода осаждения дальнейшее повышение содержания рифапентина выше 1-1,5 мг/мл не представляется возможным из-за сравнительно невысокой его растворимости в органической фазе. Из использованных соединений он лучше всего растворяется в ацетонитриле ( $\approx 20$  мг/мл), но значительно хуже, чем в дихлорметане ( $> 200$  мг/мл), который применяется в методах гомогенизации.
- При применении методов гомогенизации достижимое содержание рифапентина в препарате ограничивается устойчивостью суспензии. После некоторого предела дальнейшее увеличение загрузки рифапентина не позволяет получить лиофилизат, способный ресуспендироваться с образованием устойчивой однородной системы.
- Увеличение мощности и длительности воздействия в основном не позволяет достичь меньших размеров частиц и лучшей устойчивости системы.
- Увеличение концентрации маннита в качестве криопротектора с 1 до 3-5% позволяет получать более устойчивые системы при той же загрузке рифапентина и прочих равных условиях.
- Наилучшим с точки зрения достигнутого содержания рифапентина является метод ультразвуковой гомогенизации, позволивший достичь общего содержания рифапентина вплоть до 10 мг/мл.

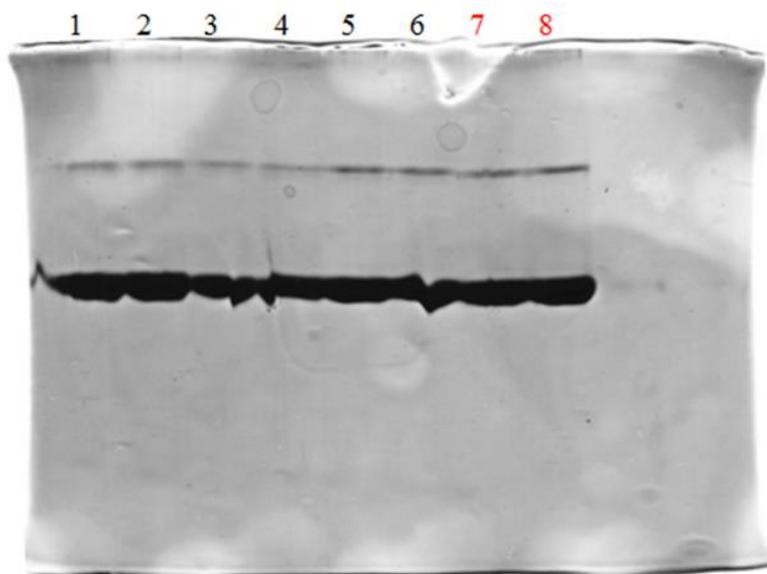
Достигнутые значения, в целом, сопоставимы с результатами, полученными Madhav P.V. и соавторами [93], которые методами твердой дисперсии с участием гидрофильных вспомогательных веществ достигли растворимости рифапентина более 6 мг/мл. В препарате же *Abraханe*<sup>®</sup> целевой концентрацией паклитаксела является 5 мг/мл при массовом соотношении альбумина и лекарства 9:1 [149], что также довольно близко к достигнутым для рифапентина результатам.

Для метода ультразвуковой гомогенизации было проведено исследование стабильности наиболее значимых компонентов лекарственной формы: рифапентина (методом ВЭЖХ) и человеческого сывороточного альбумина (методом электрофореза).

*Содержание остаточных растворителей в препарате.* С целью установления соответствия нормам содержания остаточных органических растворителей была получена партия препарата с использованием всех вышеупомянутых методов. Определение осуществлялось методом газовой хроматографии паровой фазы «Head Space» (исполнитель – ЗАО «ИИХР»). В результате исследования было установлено, что в образцах, полученных методом наноосаждения, отсутствовал остаточный растворитель (ацетонитрил). В образцах, полученных методами гомогенизации, дихлорметан содержался в допустимых пределах: менее 0,06% (ГФ XIII, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители», «Предельно допустимое содержание в лекарственных средствах остаточных органических растворителей 2 класса токсичности» [150]).

*Оценка влияния ультразвука на человеческий сывороточный альбумин.* Для оценки возможного влияния технологического процесса на структуру белка ЧСА, входящий в состав готовой формы, сравнивали с исходным ЧСА методом нативного электрофореза.

Как видно из электрофореграммы (Рис. 8), обработка ультразвуком мощностью 70 Вт в течение 6 мин не оказала неблагоприятного влияния на белок.



№№ 1-6 – ЧСА-Рпт; №№ 7-8 – исходный ЧСА

Рисунок 8. Электрофореграмма образцов водосовместимой формы рифапентина на основе ЧСА в сравнении с исходным аптечным альбумином

*Оценка степени чистоты рифапентина.* Для установления влияния технологического процесса получения водосовместимой формы на количество примесей рифапентина был использован метод ВЭЖХ.

Хроматограммы стандартного раствора рифапентина и проб, приготовленных из образцов его водосовместимой формы, представлены на Рис. 9 и 10.

Очевидно, пики основного вещества соответствуют друг другу на хроматограммах стандарта и испытуемых образцов. Между пиками характерных примесей также наблюдается соответствие, лишь несколько возросла интенсивность пиков на 3 и 8 мин на хроматограмме ЧСА-Рпт по сравнению со стандартом. Это же происходит при длительном хранении раствора субстанции. В остальном, стабильность рифапентина в применяемом технологическом процессе можно считать удовлетворительной. Содержание примесей в рифапентине, определенное методом нормировки, не превышало 5-6% (в исходной субстанции оно составляло 3-4%). Пики с малым временем удерживания (менее 1,5 мин) отвечают вспомогательным веществам, присутствующим в аптечном альбумине, в частности, N-ацетилтриптофану.

Для ряда примесей регистрировали спектры. На Рис. 11-14 видно, что большинство примесей являются родственными рифапентину соединениями. В то же время спектр в последнем пике несколько отличается от всех остальных, так как вещество практически не поглощает в видимой области. Можно полагать, что образование основных примесей обусловлено гидролизом рифапентина, в особенности, бокового заместителя в положении 3 и ацетильной группы в положении 25 (Рис. 1). Данная гипотеза подтверждается сведениями о биотрансформации рифапентина: известно, что вследствие ферментативного и неферментативного гидролиза рифапентина в организме образуются метаболиты: 3-формил, 25-дезацетил- и 3-формил-25-дезацетилрифапентин [151].

Также было определено содержание рифапентина в ряде образцов (которые впоследствии передавали для биологических испытаний). Сопоставили спектрофотометрические значения (СФ) и определение методом ВЭЖХ. Результаты представлены в Табл. 17.

Таблица 17. Содержание рифапентина в образцах его водосовместимой формы, определенное спектрофотометрически и хроматографически

№№	Общее содержание рифапентина, мг/мл		
	СФ	ВЭЖХ	
		336 нм	478 нм
1	5,24 ± 0,12 <sup>***</sup>	4,78 ± 0,27 <sup>*</sup>	4,76 ± 0,27 <sup>*</sup>
2	5,16 ± 0,31 <sup>***</sup>	4,73 ± 0,37 <sup>*</sup>	4,74 ± 0,37 <sup>*</sup>
3	9,97 ± 0,56 <sup>***</sup>	9,49 ± 0,06 <sup>**</sup>	9,52 ± 0,06 <sup>**</sup>
4	9,86 ± 0,11 <sup>***</sup>	9,42 ± 0,25 <sup>***</sup>	9,45 ± 0,26 <sup>***</sup>
5	9,74 ± 0,26 <sup>***</sup>	9,37 ± 0,38 <sup>***</sup>	9,39 ± 0,39 <sup>***</sup>

\* P = 0,05; n = 3.  
 \*\* P = 0,05; n = 4.  
 \*\*\* P = 0,05; n = 5.

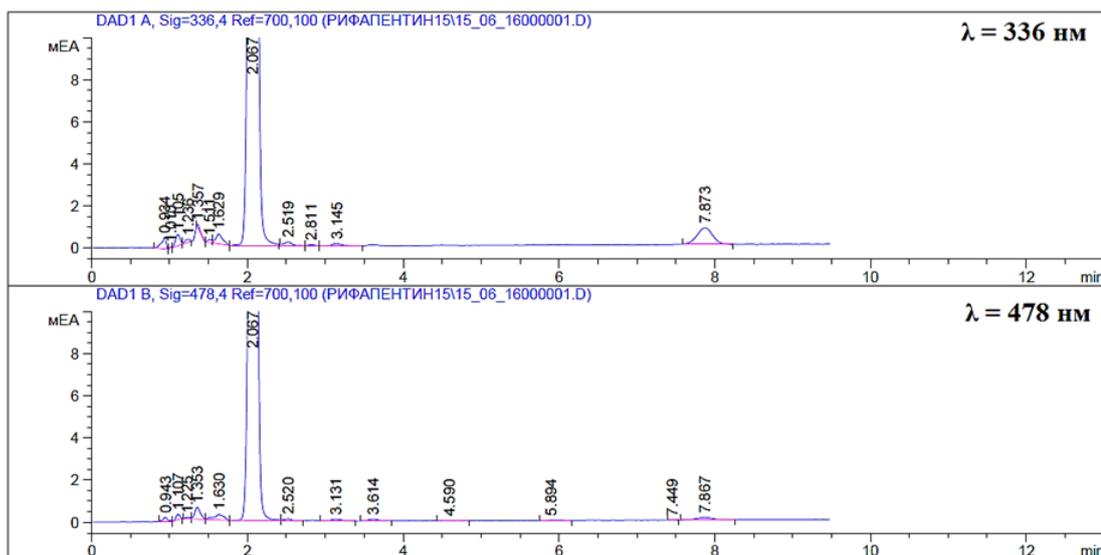


Рисунок 9. Хроматограмма стандартного раствора рифапентина (концентрацией 50 мкг/мл)

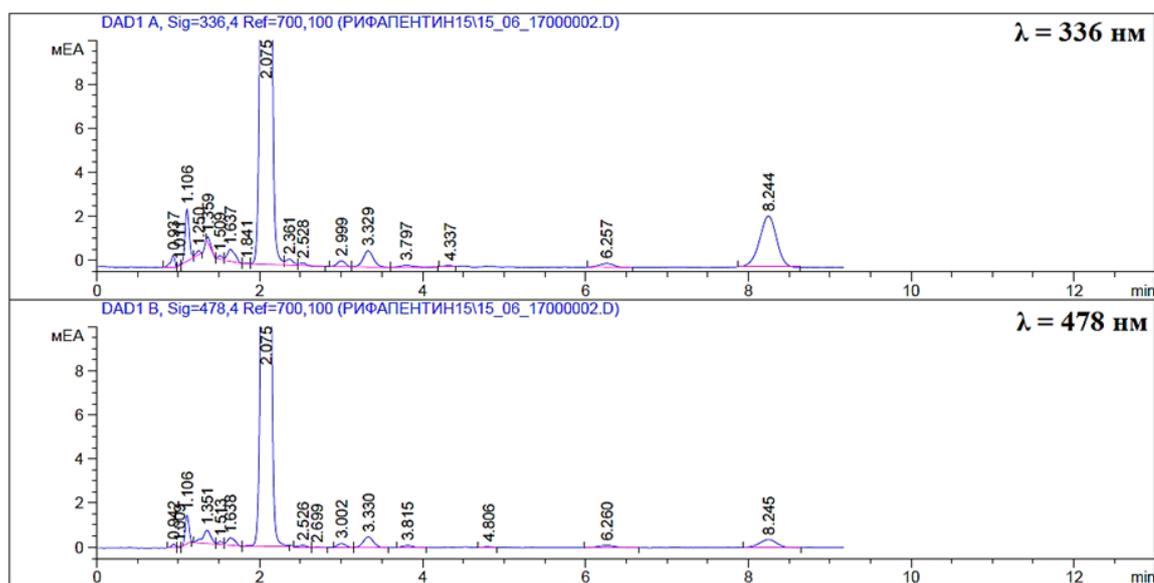


Рисунок 10. Хроматограмма образца водосовместимой формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина

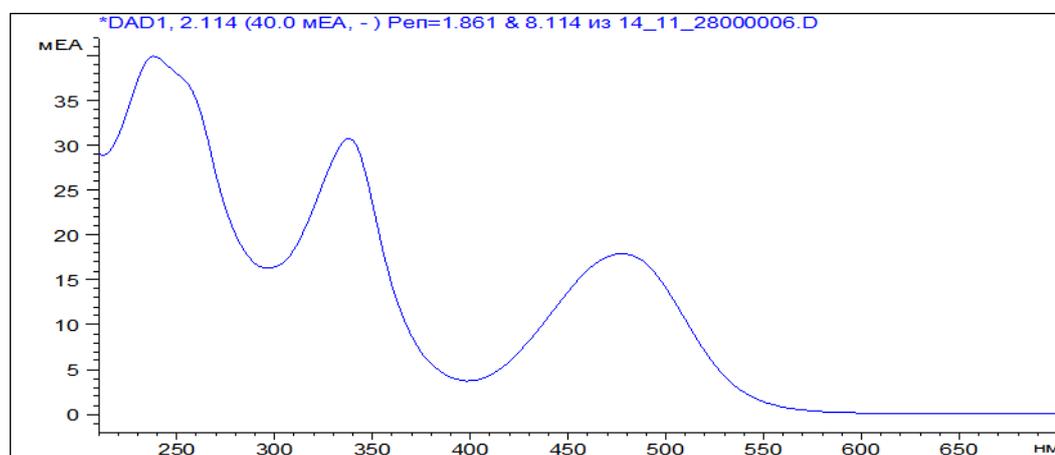


Рисунок 11. Спектр рифапентина, время удерживания ок. 2,1 мин

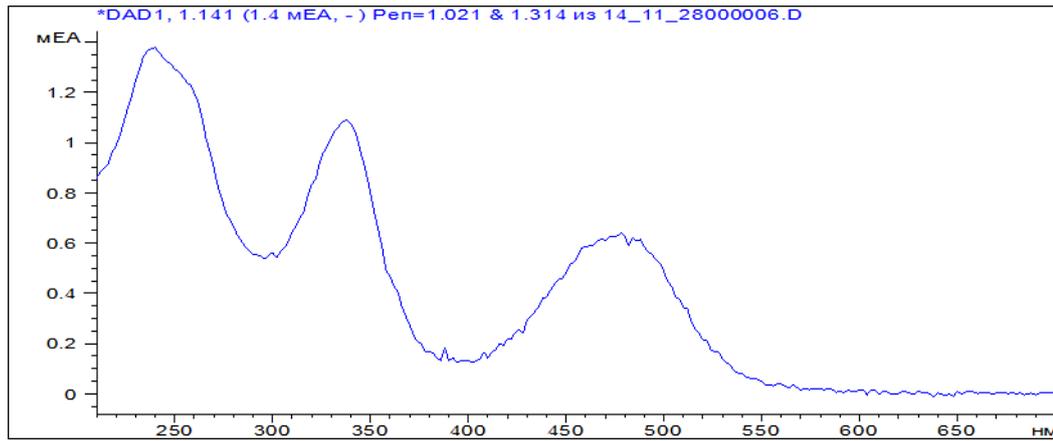


Рисунок 12. Спектр примеси, время удерживания ок. 1,1 мин

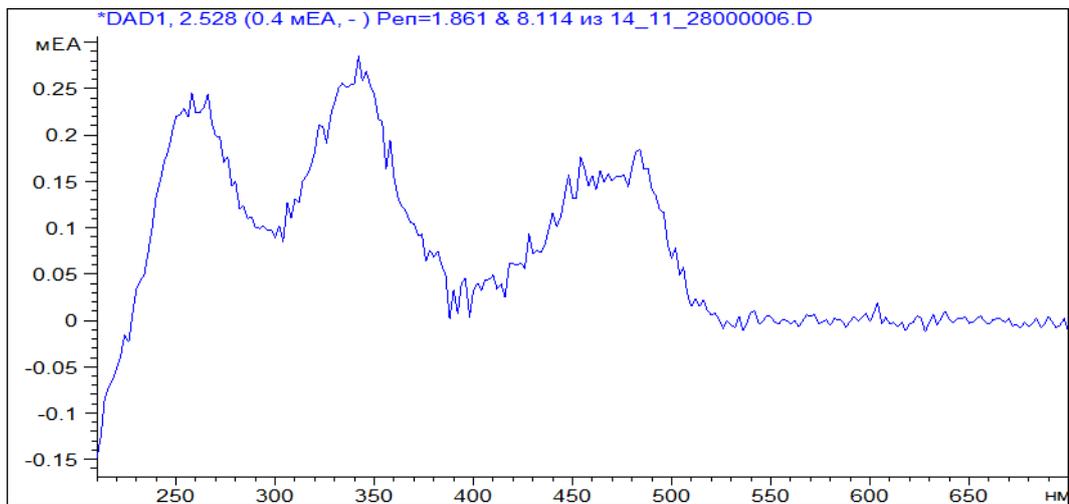


Рисунок 13. Спектр примеси, время удерживания ок. 2,5 мин

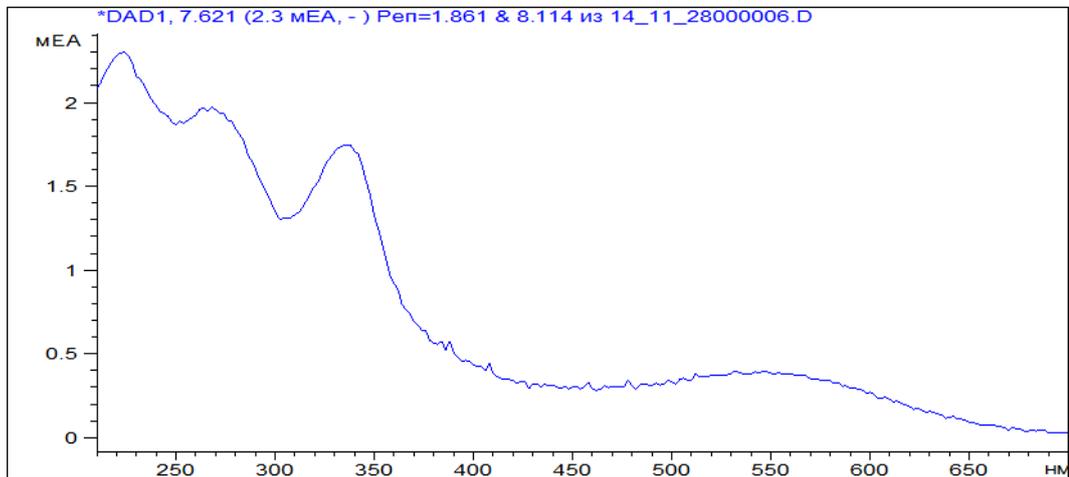


Рисунок 14. Спектр примеси, время удерживания ок. 8,0 мин

*Кинетика растворения рифапентина.* Изучение скорости растворения субстанции рифапентина в сравнении с его водосовместимой формой на основе ЧСА (в фосфатном солевом буфере с рН = 7,4 при температуре 37 °С) показало,

что и для субстанции рифапентина, и для его водосовместимой формы предел растворимости в водной фазе достигается достаточно быстро (Рис. 15). Однако в случае субстанции равновесная концентрация рифапентина (около 0,1 мг/мл) достигается за несколько часов, в то время как для водосовместимой формы равновесная концентрация рифапентина (около 0,6 мг/мл) достигается за несколько минут. Можно полагать, что ускорение растворения связано с нанометровыми размерами частиц рифапентина в препарате, а также образованием комплекса с ЧСА, обладающим повышенной растворимостью.

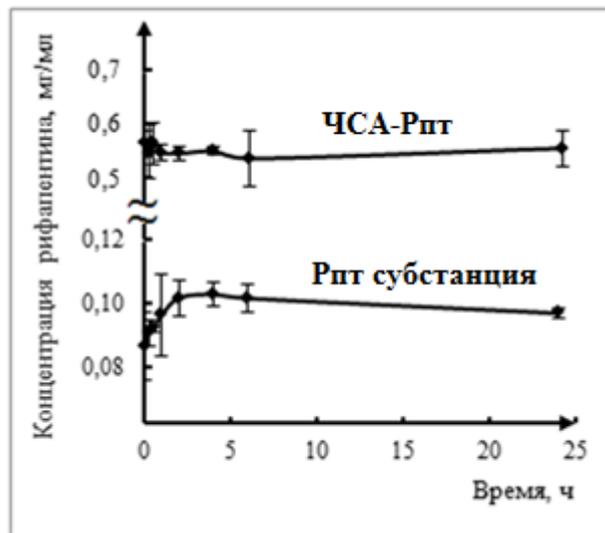


Рисунок 15. Скорость растворения субстанции рифапентина и его водосовместимой формы на основе человеческого сывороточного альбумина

После отработки технологии получения водосовместимой формы рифапентина ее испытали, используя другие белки, вместо человеческого сывороточного альбумина: сукцинированный желатин и казеинат натрия. Концентрации СЖ и КН были подобраны так, чтобы их количества были приблизительно эквимольными с ЧСА (1% СЖ и КН против 3% ЧСА). Это позволяет объективно сравнивать обеспеченные ими эффекты повышения растворимости антибиотика.

Условия экспериментов соответствовали тем, в которых были получены наилучшие образцы с ЧСА. Полученные результаты приводятся далее в п. 3.3.3.

### 3.3.2 Водосовместимая форма рифаксими́на

Для получения водосовместимой формы рифаксими́на также был использован метод ультразвуковой гомогенизации. Поскольку в случае рифапентина данный метод оказался наилучшим, было высказано предположение, что разработанный подход может быть применен при разработке водосовместимой формы рифаксими́на, антибиотика того же класса, близкого по строению к рифапентину. При этом исследовали влияние на характеристики готовой формы следующих параметров:

- растворитель и объемное соотношение фаз;
- загрузка основного вещества;
- концентрация криопротектора.

Подробные условия экспериментов приведены в Табл. 18 и 20, а характеристики полученных образцов – в Табл. 19 и 21.

Рифаксимин, в отличие от рифапентина, оказался существенно хуже растворимым в дихлорметане, и растворитель был заменен на этилацетат. Тем не менее, ни с одним из исследуемых белков не удалось получить образцов приемлемого качества методом ультразвуковой гомогенизации. Размеры частиц были слишком велики, и суспензии вскоре оседали. Ни увеличение объема водной фазы, ни уменьшение загрузки рифаксими́на, как и повышение концентрации криопротектора в суспензии, не позволили получить лиофилизатов, которые бы с легкостью ресуспендировались, образуя устойчивую систему. Следует отметить, что, несмотря на неудовлетворительные результаты, даже в этом случае наилучшим стабилизатором оказывается сукцинилированный желатин, а наилучшим – казеинат натрия.

С другой стороны, было установлено, что рифаксимин хорошо растворяется в органических жидкостях, хорошо смешивающихся с водой, в частности, в этаноле и ацетоне (по крайней мере, 100 мг/мл). В связи с этим для получения водосовместимой формы был использован метод наноосаждения. Из представленных данных следует, что в случае ЧСА и СЖ устойчивые системы также не были получены. В то же время использование в качестве

солубилизатора КН позволило получить водосовместимую форму рифаксими́на, характеризующуюся субмикронными размерами частиц (200-300 нм) и содержащую в общей сложности более 3 мг/мл рифаксими́на.

Таблица 18. Условия получения водосовместимой формы рифаксими́на методом ультразвуковой гомогенизации

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рфс, мг	N, Вт	τ, мин	Криопротектор
1	3 м/о% ЧСА; 10 мл	АсОEt; 0,5 мл	20:1	100	70	6	5 м/о% маннит
2	3 м/о% ЧСА; 7 мл	АсОEt; 0,5 мл	14:1	50	70	6	2 м/о% маннит
3	1 м/о% СЖ; 7 мл	АсОEt; 0,5 мл	14:1	50	70	6	
4	1 м/о% КН; 7 мл	АсОEt; 0,5 мл	14:1	50	70	6	

W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рфс – загрузка рифаксими́на;  
N – мощность ультразвука; τ – время гомогенизации

Таблица 19. Характеристика водосовместимой формы рифаксими́на, полученной методом ультразвуковой гомогенизации

№№	с <sub>общ.</sub> *, мг/мл	с <sub>вод.</sub> *, мг/мл	η*, масс.%	d <sub>z</sub> ** , нм	I <sub>p</sub> **
1	1,23	0,034	12,30	6880 ± 602	0,529 ± 0,118
2	0,74	0,015	10,34	6178 ± 796	0,677 ± 0,146
3	0,14	0,012	2,00	3542 ± 611	0,968 ± 0,041
4	3,65	1,90	51,12	1071 ± 26	0,994 ± 0,010

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
\*\* Приводится  $\bar{X} \pm SD$  по 4 измерениям.  
с<sub>общ.</sub> – общее содержание антибиотика; с<sub>вод.</sub> – содержание антибиотика в водной фазе; η – выход по антибиотику от теоретического значения; d<sub>z</sub> – средний диаметр частиц; I<sub>p</sub> – индекс полидисперсности

Следует отметить, что, поскольку экспериментально определенная растворимость в воде данного антибиотика составляет всего 0,00271 мг/мл, то в полученной форме общее содержание рифаксими́на превышает его растворимость более чем в 1000 раз, а концентрация рифаксими́на в водной фазе превышает его растворимость более чем в 400 раз.

Таблица 20. Условия получения водосовместимой формы рифаксими́на методом наноосаждения

№№	W	O	W:O, об.:об.	Рфс, мг	$\omega$ , об/мин	$\tau$ , ч	Криопротектор
1	3 м/о% ЧСА; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	2 м/о% маннит
2	3 м/о% ЧСА; 10 мл	Me <sub>2</sub> CO; 0,5 мл	20:1	100	450	3	5 м/о% маннит
3	3 м/о% ЧСА; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	2 м/о% маннит
4	3 м/о% ЧСА; 10 мл	EtOH; 0,5 мл	20:1	50	450	3	2 м/о% маннит
5	3 м/о% ЧСА; 10 мл	EtOH; 2 мл	5:1	50	450	3	2 м/о% маннит
6	3 м/о% ЧСА; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	5 м/о% маннит
7	3 м/о% ЧСА; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	30	450	3	2 м/о% маннит
8	1 м/о% СЖ; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	2 м/о% маннит
9	1 м/о% КН; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	2 м/о% маннит
10	1 м/о% КН; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	30	450	3	2 м/о% маннит
11	1 м/о% КН; 7 мл	EtOH; 0,5 мл	14:1	50	450	3	5 м/о% маннит
12	1 м/о% КН; 7 мл	Me <sub>2</sub> CO; 0,5 мл	14:1	100	450	3	5 м/о% маннит

W – объем водной фазы; O – объем органической фазы; Рфс – загрузка рифаксими́на;  
 $\omega$  – скорость перемешивания;  $\tau$  – время перемешивания

Таблица 21. Характеристика водосовместимой формы рифаксими́на, полученной методом наноосаждения

№№	$c_{\text{общ.}}^*$ , мг/мл	$c_{\text{вод.}}^*$ , мг/мл	$\eta^*$ , масс.%	$d_z^{**}$ , нм	$I_p^{**}$
1	1,39	0,0150	19,47	5329 ± 777	0,712 ± 0,205
2	1,36	0,0297	13,60	4899 ± 955	0,530 ± 0,083
3	1,06	0,0146	14,85	4381 ± 57	0,542 ± 0,003
4	1,07	0,0155	21,40	3829 ± 1107	0,499 ± 0,023
5	1,31	0,0159	26,20	6384 ± 232	0,376 ± 0,139
6	1,10	0,0144	15,41	3834 ± 172	0,505 ± 0,070
7	0,736	0,0145	17,16	4138 ± 224	0,491 ± 0,084
8	0,661	0,006	9,26	7068 ± 988	0,457 ± 0,016
9	4,35	1,32	60,92	501 ± 24	0,499 ± 0,080
<b>10</b>	<b>3,26</b>	<b>1,80</b>	<b>75,99</b>	<b>261 ± 4</b>	<b>0,376 ± 0,022</b>
11	4,24	1,68	59,38	302 ± 7	0,281 ± 0,022
12	7,02	2,77	49,13	472 ± 11	0,361 ± 0,028

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
 \*\* Приводится  $\bar{X} \pm SD$  по 4 измерениям.  
**Жирным шрифтом** выделены эксперименты, в которых удалось получить устойчивую суспензию.  
 Все остальные признаки неудовлетворительными.  
 $c_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $c_{\text{вод.}}$  – содержание антибиотика в водной фазе;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

- Человеческий сывороточный альбумин и сукцинизированный желатин оказываются неэффективными для повышения растворимости рифаксими́на в воде.
- Изменение соотношения фаз, уменьшение загрузки рифаксими́на и увеличение концентрации криопротектора не повышают устойчивости

суспензии, если в качестве стабилизаторов используются человеческий сывороточный альбумин или сукцинизированный желатин.

- Казеинат натрия оказывается, таким образом, единственным из используемых в работе белков, пригодным для получения водосовместимой формы рифаксимины.
- Метод наносаждения с использованием казеината натрия способствует получению более мелкодисперсных и устойчивых суспензий, нежели метод ультразвуковой гомогенизации.
- Повысить устойчивость системы возможно, регулируя загрузку рифаксимины и концентрацию маннита в суспензии перед заморозкой, в случае если в качестве стабилизатора используется казеинат натрия.

Было также сделано важное наблюдение относительно содержания антибиотика в водной фазе, что позволяет косвенно судить о механизме повышения его растворимости.

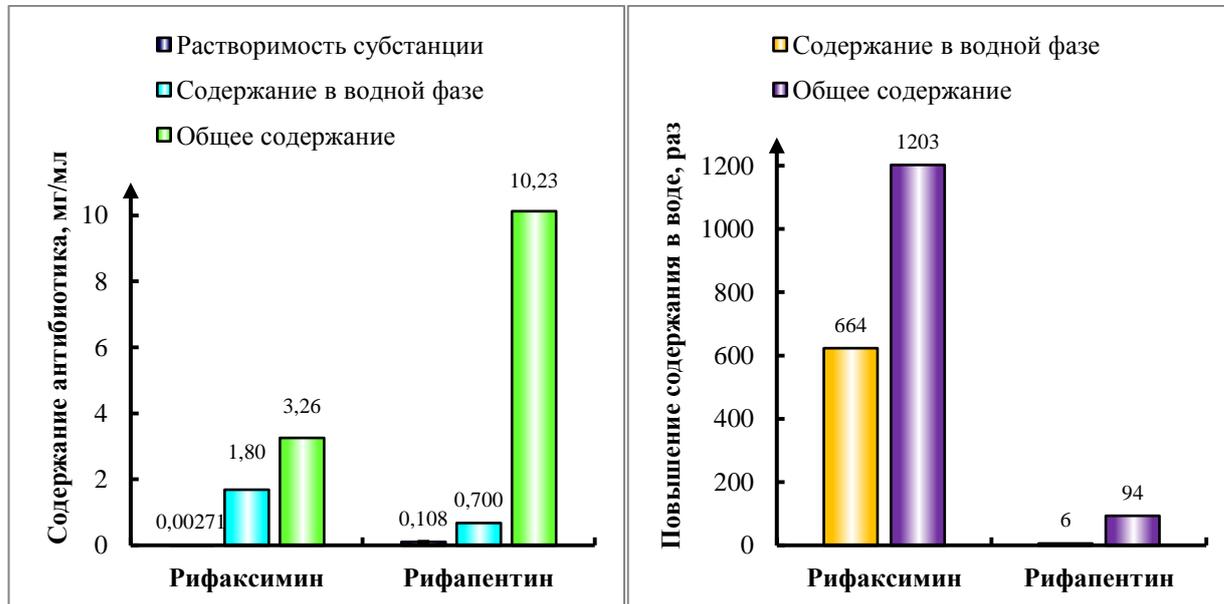
Так, для рифапентина максимальное общее содержание антибиотика в препарате ЧСА-Рпт достигало 10 мг/мл, в то время как содержание в водной фазе, как правило, не превышало 0,7 мг/мл. Таким образом, в водной фазе оказывается менее десятой части рифапентина, остальной антибиотик стабилизирован в составе дисперсной фазы. Когда суспензию разбавляли в 15-20 раз, образовывался прозрачный раствор. Очевидно, что такое происходит, когда концентрация антибиотика уменьшается до значения, равного его содержанию в водной фазе, то есть истинной растворимости.

Для рифаксимины же, в случае солюбилизации казеинатом натрия, наилучшее достигнутое общее содержание в суспензии составило более 3 мг/мл, а содержание в водной фазе – вплоть до 1,8 мг/мл, то есть более половины от общего. Это, опять же, коррелировало с образованием прозрачного раствора после дальнейшего разведения лиофилизата: в результате добавления 2-3 мл воды в 1 мл сухого препарата система уже не содержала видимых коллоидных частиц. Вероятно, это говорит о более сильном взаимодействии рифаксимины

с казеинатом натрия, нежели рифапентина. Этот вопрос был изучен впоследствии (обсуждается далее).

Интересно сопоставить между собой эффекты повышения растворимости, достигнутые для рифапентина и рифаксими́на (Рис. 16).

Экспериментально установленная растворимость (п. 3.2) рифапентина была приблизительно равной 0,1 мг/мл, а для рифаксими́на она практически в 100 раз меньше. Очевидно, что, несмотря на меньшую водную растворимость субстанции рифаксими́на, по сравнению с рифапенти́ном, повышение его растворимости было более существенным. Так, истинная растворимость рифапентина возросла в 6 раз, в то время как рифаксими́на – более чем в 600 раз. Общее содержание же рифапентина превышает растворимость субстанции почти в 100 раз, а рифаксими́на – более чем в 1200 раз. Полученные данные говорят о перспективах использования разработанных методик для создания парентеральных форм этих антибиотиков.



слева – содержание антибиотика в препарате в сравнении с растворимостью субстанции;  
справа – эффект повышения растворимости рифапентина и рифаксими́на в воде

Рисунок 16. Сравнение эффектов повышения растворимости рифапентина и рифаксими́на в воде

### 3.3.3 Статистическая оценка результатов

*Воспроизводимость.* После того как были подобраны условия для получения водосовместимой формы рифапентина и рифаксимиона, следовало испытать воспроизводимость разработанной методики, то есть повторяемость характеристик образцов от партии к партии. Чтобы убедиться в достоверности полученных данных, такая работа была проделана для каждого из используемых методов получения препарата со всеми белками.

Были отмечены условия, в которых получались агрегативно устойчивые суспензии с наибольшим общим содержанием рифапентина. Для рифаксимиона поступали аналогичным образом (объем водной фазы корректировали до 12,5 мл). Они систематизированы в Табл. 22. Используя данные условия, в 3 повторностях получали водосовместимую форму рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина, сукцинилированного желатина и казеината натрия, а также водосовместимую форму рифаксимиона на основе казеината натрия. Характеристики образцов сравнивали, используя критерии Фишера и Крускала-Уоллиса.

Таблица 22. Условия получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксимиона

Антибиотик	Метод	Условия	Органическая фаза	Водная фаза	Криопротектор
Рифапентин	Наноосаждение	450 об/мин; 3 ч	Раствор 20 мг Рпт в 0,9 мл АЦН	12,5 мл 3% ЧСА, 1% СЖ или 1% КН	Маннит 1%
	Диспергирование	24000 об/мин; 2 мин	Раствор 80 мг Рпт в 0,9 мл ДХМ	12,5 мл 3% ЧСА, 1% СЖ или 1% КН	Маннит 5%
	Гомогенизация высокого давления	12000 psi; 5 мин	Раствор 150 мг Рпт в 0,9 мл ДХМ	12,5 мл 3% ЧСА, 1% СЖ или 1% КН	Маннит 5%
	Ультразвуковая гомогенизация	70 Вт; 6 мин; 0 °С	Раствор 200 мг Рпт в 0,9 мл ДХМ	12,5 мл 3% ЧСА, 1% СЖ или 1% КН	Маннит 5%
Рифаксимин	Наноосаждение	450 об/мин; 3 ч	Раствор 50 мг Рфс в 0,9 мл Me <sub>2</sub> CO	12,5 мл 1% КН	Маннит 3%

Как и в предварительных экспериментах, наибольшая устойчивость суспензий была отмечена в случае их стабилизации казеинатом натрия. Методы отличаются достаточно хорошей воспроизводимостью: различия между сериями статистически незначимы или значимы, но численно невелики. Достаточно хорошая сходимость между сериями позволила объединять выборки в одну и рассчитывать для нее общий доверительный интервал (соответственно, уже не для 4, а 12 значений). В Табл. 23 приведены данные для объединенных выборок во всех случаях.

Очевидно, что при использовании одной и той же технологии общее содержание рифапентина в лиофилизате оказывается практически одинаковым, независимо от выбранного белка. Вместе с тем, различается содержание рифапентина в водной фазе. Можно предположить, что такие расхождения обусловлены различной связывающей способностью выбранных белков по отношению к рифапентину. Связанный с белком антибиотик оказывается, таким образом, в истинном растворе. Остальная же его часть стабилизирована белком в виде суспензии. Причем в случае ЧСА и КН, как очевидно, повышение истинной растворимости рифапентина приблизительно одинаково (до 0,6-0,7 мг/мл), а в случае СЖ оказывается почти вдвое меньшим.

Размеры частиц и устойчивость суспензий также неодинаковы. Для ЧСА-Рпт и КН-Рпт размеры находятся в пределах 400-700 нм, распределение достаточно узкое (индекс полидисперсности чуть выше 0,2). Для СЖ-Рпт размеры частиц на порядок величины крупнее, т.е. уже не являются субмикронными. Полидисперсность в этом случае также очень высока. Полученные данные коррелируют с ресуспендируемостью лиофилизата. Водосовместимая форма на основе СЖ весьма неустойчива, частицы быстро оседают. ЧСА и КН дают практически одинаковые результаты, но в случае КН суспензии устойчивы еще более длительное время, несмотря на несколько большие размеры частиц.

Таблица 23. Характеристика водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины

Состав	Метод	$c_{\text{общ.}}$ мг/мл	$c_{\text{вод.}}$ мг/мл	$\eta$ , масс. %	$d_z$ , нм	$I_p$
ЧСА-Рпт	Наноосаждение	$1,13 \pm 0,03$	$0,647 \pm 0,022$	70,83	$404 \pm 11$	$0,252 \pm 0,013$
СЖ-Рпт		$1,14 \pm 0,04$	$0,262 \pm 0,006$	71,25	$4494 \pm 645$	$0,533 \pm 0,065$
КН-Рпт		$1,04 \pm 0,03$	$0,671 \pm 0,026$	62,51	$203 \pm 3$	$0,346 \pm 0,024$
ЧСА-Рпт	Диспергирование	$4,90 \pm 0,07$	$0,755 \pm 0,013$	76,51	$1567 \pm 66$	$0,616 \pm 0,056$
СЖ-Рпт		$4,69 \pm 0,07$	$0,338 \pm 0,004$	73,28	$5309 \pm 1029$	$0,466 \pm 0,102$
КН-Рпт		$4,38 \pm 0,14$	$0,548 \pm 0,013$	68,44	$2791 \pm 151$	$0,342 \pm 0,032$
ЧСА-Рпт	Гомогенизация высокого давления	$6,58 \pm 0,11$	$0,666 \pm 0,010$	54,83	$290 \pm 5$	$0,186 \pm 0,017$
СЖ-Рпт		$6,66 \pm 0,13$	$0,333 \pm 0,003$	55,50	$6099 \pm 1149$	$0,690 \pm 0,114$
КН-Рпт		$6,78 \pm 0,13$	$0,666 \pm 0,023$	56,50	$574 \pm 26$	$0,336 \pm 0,025$
ЧСА-Рпт	Ультразвуковая гомогенизация	$9,93 \pm 0,14$	$0,673 \pm 0,014$	62,04	$453 \pm 15$	$0,239 \pm 0,013$
СЖ-Рпт		$9,43 \pm 0,14$	$0,332 \pm 0,005$	58,98	$7956 \pm 793$	$0,797 \pm 0,071$
КН-Рпт		$10,13 \pm 0,18$	$0,681 \pm 0,018$	63,31	$648 \pm 8$	$0,233 \pm 0,011$
КН-Рфс	Наноосаждение	$2,91 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,03$	72,75	$282 \pm 7$	$0,307 \pm 0,023$

Доверительные интервалы приводятся во всех случаях для объединенной выборки по 3 сериям ( $P = 0,05$ ;  $n = 12$ ).

$c_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $c_{\text{вод.}}$  – содержание антибиотика в водной фазе;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

Как правило, статистически достоверным оказывалось сходство в содержании антибиотиков в водосовместимых формах, в то время как размеры частиц различались чаще. По-видимому, это можно объяснить существованием в системе агрегатов переменного состава, поскольку, как отмечалось выше, значительная часть антибиотика стабилизирована в виде суспензии.

Наибольшие расхождения наблюдаются при применении всех методов в случае использования сукцинированного желатина. Возможно, это связано с тем, что для получения желатина используется гидролиз, в результате чего его структура оказывается нерегулярной и различается от партии к партии. Расхождения проявлялись, прежде всего, в высоких (вплоть до величины 0,8) значениях индекса полидисперсности, особенно при использовании методов гомогенизации. Однако и в этом случае выборки объединяли, так как столь широкие доверительные интервалы не позволяют объективно судить о достоверности их различий.

*Квалиметрическая оценка полученных образцов.* Дополнительно на качественном уровне осуществлялась оценка оптимальности технологических

параметров с использованием расчетных критериев метода Харрингтона. Данный метод широко применяется в разработке новых рецептур [152].

С целью определения кодированных коэффициентов и функции отклика в каждом методе обозначили ожидаемое наилучшее и наихудшее значение характеристик образцов и выполнили расчеты по формулам (5)-(9). О качестве достигнутых результатов судили по сочетанию характеристик: общему содержанию антибиотика и его содержанию в водной фазе, выходу по антибиотику, среднему диаметру частиц и индексу полидисперсности. Выводы приведены в Табл. 24.

Очевидно, что сделанные по значениям функции желательности выводы соответствуют экспериментальным наблюдениям: так, гомогенизация с помощью диспергатора является наименее целесообразной среди методов гомогенизации для получения водосовместимой формы рифапентина. Для получения водосовместимой формы рифаксимиона метод наноосаждения оказался единственным приемлемым, при этом он характеризовался самым высоким значением функции желательности среди рассмотренных случаев.

Таблица 24. Квалиметрическая оценка водосовместимой формы рифапентина и рифаксимиона на основе белков

Состав	Метод	$C_{\text{общ.}}$ мг/мл	$C_{\text{вод.}}$ мг/мл	$\eta$ , масс. %	$d_z$ , нм	$I_p$	Функция желательности	Оценка *
ЧСА-Рпт	Наноосаждение	1,13	0,647	70,83	404	0,252	0,684	Хор.
ЧСА-Рпт	Диспергирование	4,90	0,755	76,51	1567	0,616	0,514	Удовл.
ЧСА-Рпт	Гомогенизация высокого давления	6,58	0,666	54,83	290	0,186	0,684	Хор.
ЧСА-Рпт	Ультразвуковая гомогенизация	9,93	0,673	62,04	453	0,239	0,689	Хор.
КН-Рфс	Наноосаждение	2,91	1,16	72,75	282	0,307	0,722	Хор.

\* Очень хорошо – от 0,8; хорошо – от 0,63 до 0,8; удовлетворительно – от 0,37 до 0,63; плохо – от 0,20 до 0,37; очень плохо – менее 0,20 [115].

$C_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $C_{\text{вод.}}$  – содержание антибиотика в водной фазе;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

*Альтернативная технология с использованием Pluronic® F-68.* Как было отмечено в экспериментах по изучению влияния различных факторов на растворимость рифапентина, в случае использования Pluronic® F-68

образовывался не насыщенный раствор рифапентина с осадком избытка субстанции, а устойчивая однородная суспензия, практически аналогичная той, что образуется в его водосовместимой форме на основе белков. В связи с этим была предпринята попытка получить водосовместимую форму рифапентина на основе Pluronic® F-68 в качестве возможной альтернативы белкам.

В работе использовали метод наноосаждения (эксперименты №№ 1-2) и ультразвуковой гомогенизации (эксперименты №№ 3-4). В методе наноосаждения загрузка рифапентина составляла 40 мг (в 0,9 мл ацетона). В методе ультразвуковой гомогенизации загрузка составляла 70 мг (в 1,8 мл дихлорметана). Водная фаза содержала 12,5 мл 1% (эксперименты №№ 1 и 3) или 2% (эксперименты №№ 2 и 4) полоксамера. Прочие условия были теми же. Добавляли 5% маннита в качестве криопротектора.

Все эксперименты проводились в 3 повторностях. Выборки также объединяли в связи с хорошей воспроизводимостью характеристик партий. Экспериментальные данные представлены в Табл. 25.

Таблица 25. Получение и исследование водосовместимой формы рифапентина на основе Pluronic® F-68

№№	Метод	$c_{\text{общ.}}$ , мг/мл	$\eta$ , масс. %	$d_z$ , нм	$I_p$
1	Наноосаждение	$2,70 \pm 0,20$	84,38	$628 \pm 25$	$0,299 \pm 0,037$
2		$2,66 \pm 0,39$	83,13	$475 \pm 9$	$0,156 \pm 0,045$
3	Ультразвуковая гомогенизация	$0,66 \pm 0,04$	11,79	$1283 \pm 56$	$0,360 \pm 0,036$
4		$0,32 \pm 0,01$	5,71	$727 \pm 14$	$0,380 \pm 0,021$
Во всех случаях: $P = 0,05$ ; $n = 12$ .					
$c_{\text{общ.}}$ – общее содержание антибиотика; $\eta$ – выход по антибиотику от теоретического значения; $d_z$ – средний диаметр частиц; $I_p$ – индекс полидисперсности					

Во всех экспериментах образовывались однородные суспензии, которые могли несколько часов храниться в холодильнике без образования осадка. В отличие от водосовместимой формы рифапентина на основе белков, в данном случае более эффективным оказывается не метод ультразвуковой гомогенизации, а метод наноосаждения. Это очевидно, уже исходя из выхода по антибиотику: в случае метода гомогенизации он оказывается немногим больше 10%, в то время

как в случае осаждения превышает 80%. Причем использование 2% Pluronic<sup>®</sup> F-68 не повышает эффективности солюбилизации, по сравнению с концентрацией 1%.

Использование метода наноосаждения в присутствии Pluronic<sup>®</sup> F-68 позволило достичь содержания рифапентина 2,70 мг/мл. Хотя это значение меньше, чем удавалось достичь, используя белки, эффект весьма значителен: растворимость субстанции была превышена почти в 30 раз. Размеры частиц (около 600 нм) были практически теми же, что и в случае стабилизации суспензии белком.

Таким образом, при необходимости возможна дальнейшая разработка подобной альтернативной технологии повышения растворимости рифапентина. Кроме того, известно об эффективности полимеров типа Pluronic<sup>®</sup> (поллоксамеры) в лечении инфекционных заболеваний, в том числе, туберкулеза. Pluronic<sup>®</sup> F-68 обладает иммуномодулирующим действием, заключающимся в стимуляции фагоцитоза и, как следствие, некоторой активностью против опухолей и инфекционных агентов. Можно полагать, что поллоксамер способен обеспечить усиление эффекта антибиотиков [153, 154].

### **3.3.4 Влияние условий заморозки на характеристики водосовместимой формы рифапентина**

Процесс получения водосовместимой формы антибиотика во всех случаях завершался стадией лиофилизации, которая, очевидно, вносит существенный вклад в свойства получаемого продукта.

В работе использовалась лиофильная сушилка Alpha-Christ 2-4 LSC. Давление в камере составляло 0,340 бар на I этапе и 0,035 мбар на II этапе сушки; температуры полок составляли 0 °С и 15 °С на I и II этапе, соответственно; температура конденсатора составляла -90 °С во всех случаях. Время сушки выбирали в зависимости от объема получаемого лиофилизата, прочие параметры сохраняли неизменными по умолчанию, в соответствии с настройками производителя.

Однако, кроме непосредственно самой сушки, имеют значения и условия заморозки, а также криопротекторы, которые добавляются в систему перед этим. Так как в основе получаемого продукта лежат белки, принципиально важна сохранность их структуры в процессе лиофилизации [155, 156].

Хотя сами белки способны выступать в качестве криопротекторов, для их защиты используются низкомолекулярные вещества, в особенности, углеводы. Так, маннит, применяемый в настоящей работе, образует эвтектические смеси с водой и в связи с этим обеспечивает системе более высокую температуру плавления. Однако с его использованием связаны и некоторые проблемы. Например, он кристаллизуется в случае повторного нагревания раствора в процессе сушки, что может повредить осушаемый продукт и тару. Твердое состояние маннита весьма сложно и известны несколько его полиморфных форм, в частности,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\delta$ . Известен факт существования кристаллогидрата маннита конкурентно с кристаллами безводного маннита. Возможно также и образование аморфной фазы маннита, что было доказано методом дифференциальной спектрокалориметрии [157-159].

Образование кристаллического гидрата (доказано методом рентгеновского рассеяния) влияет на проведение процесса сушки, так как скорость удаления воды из кристаллической решетки лимитирует скорость сушки. Кроме того, остаточная вода, которую нельзя осушить, может нанести ущерб нестабильному продукту [160].

Стабилизация белков обусловлена несколькими механизмами. Согласно одному из них, происходит вытеснение его водородных связей с водой за счет более прочного связывания со вспомогательным веществом. С другой стороны, стабилизация может быть обусловлена т.н. «стеклованием». Первый механизм носит термодинамический, а второй – кинетический характер. В последнем случае происходит изменение механических свойств системы и при достижении определенных условий (температуры стеклования) белок оказывается заключенным в стекловидную матрицу [161]. В результате этого снижается его

мобильность и, следовательно, скорость происходящих с ним изменений: развертка структуры, агрегация, разложение.

Возможно сочетание нескольких криопротекторов. Так, совместное применение маннита и сахарозы позволяет образовать защитную объемную структуру, при этом сохраняя существование в системе аморфной фазы [162]. Поскольку, как было сказано выше, сохранность белка определяется переходом между эластичным и стекловидным состоянием, сушка должна осуществляться ниже температуры стеклования. Маннит позволяет повысить температуру стеклования смеси, тем самым смягчая условия сушки. Однако его кристаллическая форма неспособна эффективно связываться с белком, и это свойство можно компенсировать добавлением в состав сахарозы.

В то же время имеет значение и характер заморозки. Было установлено, что предварительная выдержка («отжиг») осушаемой системы при более высокой температуре перед окончательным достижением температуры сушки способствует более интенсивному росту кристаллов льда [163]. В результате этого в ходе сушки образуются более крупные поры и водяной пар, исходящий из осушаемой системы, встречает меньшее сопротивление на своем пути.

Учитывая вышесказанное, было поставлено несколько экспериментов с целью установить влияние условий заморозки и выбора криопротектора на свойства получаемого препарата. Все образцы были получены в одинаковых условиях и отличались только способом заморозки и составом криопротектора. Суспензии для заморозки получали методом ультразвуковой гомогенизации (см. Табл. 22). Экспериментальные данные приведены ниже в Табл. 26.

Таблица 26. Изучение влияния условий заморозки и состава криопротектора на характеристики водосовместимой формы рифапентина на основе ЧСА

№№	Заморозка	Криопротектор *	$c_{\text{общ.}}^{**}$ , мг/мл	$c_{\text{вод.}}^{**}$ , мг/мл	$\eta$ , масс. %	$d_z^{***}$ , нм	$I_p^{***}$	Наблюдение
1	-70 °С (4 ч)	ман.	10,33	0,572	64,56	495 ± 9	0,258 ± 0,013	Трещины
2	-70 °С (4 ч)	4 ман.:1 сах.	10,82	0,550	67,63	431 ± 3	0,221 ± 0,019	Трещины
3	5 °С (15 мин); -20 °С (15 мин); -70 °С (2 ч); -20 °С (2 ч)	3,75 ман.:1,25 сах.	10,25	0,711	64,06	535 ± 12	0,251 ± 0,020	Вспенивание
4	5 °С (30 мин); -20 °С (30 мин); -70 °С (3 ч)	3,75 ман.:1,25 сах.	9,77	0,900	61,06	730 ± 11	0,285 ± 0,033	Гладкий
<p>* Общая концентрация во всех случаях 5 м/о%; ман. – маннит, сах. – сахароза.  ** Приводится среднее значение 5 измерений.  *** Приводится <math>\bar{X} \pm S</math> по 4 измерениям.  <math>c_{\text{общ.}}</math> – общее содержание антибиотика; <math>c_{\text{вод.}}</math> – содержание антибиотика в водной фазе; <math>\eta</math> – выход по антибиотику от теоретического значения; <math>d_z</math> – средний диаметр частиц; <math>I_p</math> – индекс полидисперсности</p>								

Поставленные 4 эксперимента отличались друг от друга попарно с точки зрения условий заморозки и состава криопротектора. Так, в эксперименте № 1 использовали стандартные условия, в которых получали все ранее рассмотренные образцы. В эксперименте № 2 вместо маннита использовали его смесь с сахарозой (4:1). Исследование образцов показало, что такое изменение слабо сказывается на свойствах образцов. В обоих случаях лиофилизаты плотно прилегли к стенкам сосуда и имели несколько трещин на поверхности.

В эксперименте № 3 была в дальнейшем увеличена доля сахарозы в смеси (3,75:1,25), а также изменены условия заморозки: образцы выдерживали в холодильнике, стандартном морозильнике и при -70 °С, после чего вновь помещали в обычный морозильник. Однако в этом случае лиофилизат отрывался от стенок сосуда и содержал множество пузырей. По этой причине в эксперименте № 4 устранили последнюю стадию выдержки замороженной суспензии при более высокой температуре. Несмотря на несколько большие размеры частиц, в этом случае лиофилизат имел наилучший внешний вид. Прочие характеристики оставались практически неизменными.

Таким образом, желательно проводить постепенную заморозку образцов с последующим охлаждением до  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , используя маннит в смеси с сахарозой (3,75:1,25).

### 3.3.5 Масштабирование эксперимента по получению водосовместимой формы рифапентина

Для оценки устойчивости разработанного метода получения водосовместимой формы рифапентина и его ограничений были проведены эксперименты по масштабированию технологии. Их принцип заключался в пропорциональном увеличении объема партии препарата и всех компонентов, используемых для этого. При этом условия получения образцов были теми же, что и для получения малой партии.

Проведенные эксперименты по масштабированию процесса получения водосовместимой формы рифапентина описаны ниже в Табл. 27.

Таблица 27. Масштабирование эксперимента по получению водосовместимой формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина

№№	Изменяемый технологический параметр	$c_{\text{общ.}}^*$ , мг/мл	$\eta^*$ , масс.%	$d_z^{**}$ , нм	$I_p^{**}$
1	4-кратная загрузка компонентов на цикл; 1 цикл; роторный испаритель; 5 м/о% маннит	$11,6 \pm 1,2$	72,50*	$542 \pm 6$	$0,320 \pm 0,033$
2	4-кратная загрузка компонентов на цикл; 8 циклов; роторный испаритель; 5 м/о% маннит	$13,5 \pm 0,9$	84,38	$2342 \pm 106$	$1,000 \pm 0,000$
3	4-кратная загрузка компонентов на цикл; 4 цикла; роторный испаритель; 5 м/о% маннит	$12,5 \pm 0,9$	78,13	$1483 \pm 130$	$0,812 \pm 0,025$
4	<b>На 30% меньше <math>R_{пт}</math> на цикл; 4 цикла; перемешивание; 6 м/о% маннит</b> ***	<b><math>9,3 \pm 0,3</math></b>	<b>76,94</b>	<b><math>645 \pm 10</math></b>	<b><math>0,230 \pm 0,015</math></b>

\* Приводится среднее значение 5 измерений.  
 \*\* Приводится  $\bar{X} \pm S$  по 4 измерениям.  
 \*\*\* Получали 3 параллельные серии.  
**Жирным шрифтом** выделены эксперименты, в которых удалось осуществить увеличение объема партии, практически сохраняя ее характеристики.  
 $c_{\text{общ.}}$  – общее содержание антибиотика;  $\eta$  – выход по антибиотику от теоретического значения;  $d_z$  – средний диаметр частиц;  $I_p$  – индекс полидисперсности

В эксперименте № 1 увеличили загрузку по всем компонентам пропорционально в 4 раза. В результате этого характеристики образцов

оставались удовлетворительными: размеры частиц и индекс полидисперсности практически не увеличивались, лиофилизат с легкостью ресуспендировался и суспензия сохраняла устойчивость 3-4 ч. Несколько увеличилось общее содержание рифапентина, что можно объяснить меньшими его потерями в связи с большим объемом партии.

В силу того, что используемый в работе ультразвуковой гомогенизатор рассчитан на небольшие объемы, дальнейшее увеличение партии не представлялось возможным. Поэтому стали объединять несколько серий по 50 мл, проводя, таким образом, несколько циклов и затем лиофилизируя суспензию, полученную смешением таких порций.

Используя те же условия, (эксперимент № 2), провели 8 таких циклов, то есть партия состояла из 8 серий (по 50 мл). Для ускорения процесса остаточный растворитель отгоняли под вакуумом. Полученные в результате образцы имели неудовлетворительное качество (крупные размеры частиц, не ресуспендировались). Уменьшение количества серий (эксперимент № 3) до 4 циклов по 50 мл также не позволило получить существенно лучших результатов. Было предположено, что это может быть вызвано использованием роторного испарителя, так как ранее отмечали увеличение размера частиц после вакуумной отгонки растворителя. Впоследствии растворитель устраняли перемешиванием (в течение 2 ч, считая от первого цикла), и добавляли в систему маннит не по окончании всех циклов, а после каждого, предполагая, что он способен стабилизировать систему. Однако замена отгонки под вакуумом длительным перемешиванием, как и увеличение времени гомогенизации ультразвуком, не позволили получить большую партию препарата приемлемого качества (данные не приводятся).

Исходя из результатов предыдущих экспериментов, для повышения устойчивости системы уменьшили загрузку рифапентина и повысили концентрацию маннита в суспензии. Партии получали в 3 повторностях (эксперимент № 4). Учитывая то, что в большем объеме партии содержание рифапентина оказывалось выше, уменьшение его загрузки ( $\approx$  на 30%)

практически не сказалось на его содержании в полученных образцах (9-9,5 мг/мл против 10 мг/мл в малых партиях). Размеры частиц и индекс полидисперсности были практически такими же, как и в случае проведения 1 цикла.

Таким образом, масштабирование технологии в условиях проводимой работы возможно за счет получения нескольких серий препарата с последующим объединением их в одну партию, при этом уменьшая загрузку рифапентина.

### **3.4 Изучение связывания антибиотиков с белками**

В результате выполненной работы по получению водосовместимой формы рифапентина и рифаксимины был сделан вывод о том, что повышение растворимости антибиотиков происходит за счет увеличения их содержания в водной фазе и за счет стабилизации субстанции в виде наноразмерной суспензии. Причем для рифапентина преимущественный вклад вносит стабилизация суспензии, а в случае рифаксимины в равной степени присутствуют оба фактора (см. Рис. 16). Так же, как было сказано выше, разбавление полученных суспензий до концентрации антибиотика, равной его содержанию в водной фазе, приводило к образованию прозрачной системы, размер частиц в которой (10-20 нм) соответствовал размеру частиц в растворе белка без антибиотика. Подобные явления были описаны для препарата *Abraxane*<sup>®</sup>. Предполагаемая схема образующейся системы, по аналогии с *paб*-паклитакселом, приведена на Рис. 17.

Полученные данные также подтверждаются экспериментами по определению растворимости рифапентина (п. 3.2), где было установлено, что в присутствии белков она оказывалась большей. Этот факт также говорит о взаимодействии антибиотиков с белками.

Молярное соотношение между общим содержанием рифапентина и содержанием белка в образцах с наибольшим содержанием рифапентина в среднем составляло 25:1 (Табл. 28). Для рифаксимины это соотношение составляло 8:1. При этом молярное соотношение между содержанием в водной фазе и содержанием белка в случае рифапентина составляло около 1,7:1, в то время как для рифаксимины было равно 3:1. Интересно, что в случае препарата

Abraхане® более 6 молекул паклитаксела приходится на 1 молекулу белка в комплексе [105], то есть, несмотря на аналогичную технологию, ключевую роль играет комплексообразование.

Таблица 28. Соотношение между общим содержанием антибиотика, содержанием антибиотика в водной фазе и содержанием белка в водосовместимых формах рифапентина и рифаксими́на

Состав	Содержание белка (с <sub>бел.</sub> )*		Содержание антибиотика				с <sub>вод.</sub> :с <sub>бел.</sub> МОЛЬ:МОЛЬ	С <sub>общ.</sub> :с <sub>бел.</sub> МОЛЬ:МОЛЬ
	мг/мл	ммоль/мл	С <sub>общ.</sub> мг/мл	С <sub>общ.</sub> ммоль/мл	с <sub>вод.</sub> мг/мл	с <sub>вод.</sub> ммоль/мл		
ЧСА-Рпт	30	0,451	9,93	11,32	0,673	0,767	<b>1,70</b>	<b>25,10</b>
СЖ-Рпт	10	0,431	9,43	10,75	0,332	0,379	<b>0,879</b>	<b>24,94</b>
КН-Рпт	10	0,455	10,13	11,55	0,681	0,777	<b>1,71</b>	<b>25,38</b>
КН-Рфс	10	0,455	2,91	3,70	1,16	1,48	<b>3,24</b>	<b>8,13</b>

\* Для расчета предполагалось, что содержание белка в препарате равно его исходному количеству, взятому для получения водосовместимой формы, то есть 3% ЧСА, 1% СЖ и 1% КН.  
Использовались следующие значения молекулярной массы: М(ЧСА) = 66500 г/моль;  
М(СЖ) = 23200 г/моль; М(КН) = 22000 г/моль; М(Рпт) = 877,04 г/моль; М(Рфс) = 785,88 г/моль.  
с<sub>общ.</sub> – общее содержание антибиотика; с<sub>вод.</sub> – содержание антибиотика в водной фазе

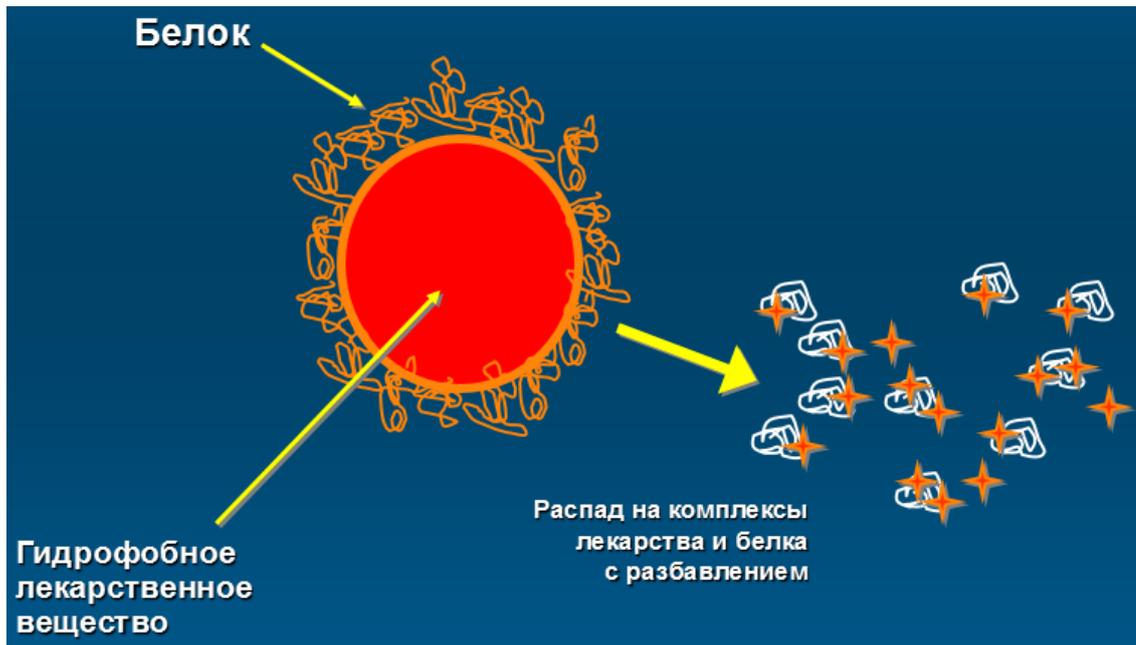


Рисунок 17. Схематическое изображение структуры водосовместимых лекарственных форм на основе белков [164]

Для уточнения полученных значений было определено также содержание белка в образцах водосовместимой формы рифапентина (на примере ЧСА) методом капиллярного электрофореза. Была предварительно построена

калибровочная зависимость (Рис. 18) площади пика белка от его концентрации, на основании которой определялось его содержание в образцах.

Общее содержание ЧСА в водосовместимой форме составило 27 мг/мл, что практически равно исходной его концентрации, использованной в технологическом процессе (30 мг/мл), то есть при этом практически не происходит потерь белка, в отличие от антибиотика. То же количество белка содержалось в супернатанте, отделенном после осаждения суспензии. Осадок же не содержал белка. Это также подтверждает тот факт, что полученная водосовместимая форма представляет собой систему из комплекса белка с антибиотиком и стабилизированной белком суспензии. При этом адгезия белка на частицах субстанции оказывается обратимой, и после удаления дисперсной фазы белок остается в растворе, как показали проведенные измерения.

Очевидно, что содержание антибиотика в водной фазе складывается из свободного антибиотика и антибиотика, связанного с белком. Для оценки параметров взаимодействия между белком и антибиотиком использовался флуориметрический метод.

Эксперимент показал, что тушение флуоресценции ЧСА, СЖ и КН происходит закономерно с ростом концентрации рифапентина (Табл. 29-32). Для рифаксимины оно наблюдалось только в системах с казеинатом натрия, а в остальных случаях, по-видимому, взаимодействие недостаточно сильное, чтобы установить его статистически достоверно.

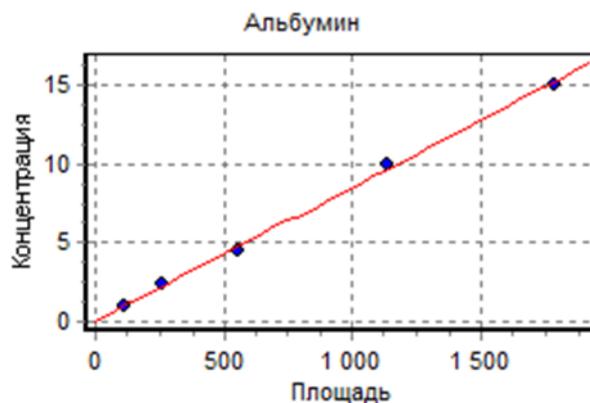


Рисунок 18. Калибровка для определения человеческого сывороточного альбумина методом капиллярного электрофореза ( $R^2 > 0,99$ )

Таблица 29. Изучение тушения флуоресценции раствора человеческого сывороточного альбумина рифапентином

№№	[Q], мкмоль/л	lg[Q]	F*, у.е.	$\frac{F_0^*}{F}$	$\lg \frac{F_0 - F}{F}$
1	0	-	1015,986	-	-
2	5	0,699	920,563	1,10 ± 0,02	-0,985 ± 0,100
3	7,5	0,875	838,264	1,21 ± 0,04	-0,674 ± 0,083
4	10	1,000	772,143	1,32 ± 0,05	-0,501 ± 0,067
5	15	1,176	650,795	1,56 ± 0,07	-0,251 ± 0,053
6	20	1,301	559,843	1,81 ± 0,01	-0,089 ± 0,004
7	25	1,398	491,798	2,07 ± 0,14	0,028 ± 0,056
8	30	1,477	427,158	2,38 ± 0,09	0,139 ± 0,027
9	35	1,544	377,179	2,69 ± 0,10	0,229 ± 0,027
10	40	1,602	329,790	3,08 ± 0,26	0,318 ± 0,054
11	50	1,699	257,657	3,95 ± 0,37	0,469 ± 0,053
12	75	1,875	144,669	7,02 ± 0,28	0,780 ± 0,020

\* Измерения проводились при длине волны поглощения  $\lambda_{ex} = 295$  нм, длина волны испускания составляла  $\lambda_{em} = 350$  нм. Во всех случаях: P = 0,05; n = 3.  
 $F_0$  – исходная интенсивность флуоресценции раствора белка; F – интенсивность флуоресценции раствора белка в присутствии антибиотика; [Q] – концентрация антибиотика

Таблица 30. Изучение тушения флуоресценции раствора сукцинированного желатина рифапентином

№№	[Q], мкмоль/л	lg[Q]	F*, у.е.	$\frac{F_0^*}{F}$	$\lg \frac{F_0 - F}{F}$
1	0	-	36,563	-	-
2	5	0,699	33,344	1,10 ± 0,02	-1,017 ± 0,095
3	7,5	0,875	30,254	1,21 ± 0,08	-0,686 ± 0,156
4	10	1,000	28,970	1,26 ± 0,06	-0,584 ± 0,096
5	15	1,176	25,844	1,41 ± 0,08	-0,384 ± 0,081
6	20	1,301	21,642	1,69 ± 0,25	-0,165 ± 0,155
7	25	1,398	18,151	2,02 ± 0,45	0,002 ± 0,188
8	30	1,477	15,002	2,44 ± 0,33	0,156 ± 0,098
9	35	1,544	12,059	3,03 ± 0,21	0,308 ± 0,045
10	40	1,602	11,190	3,27 ± 0,61	0,354 ± 0,114
11	50	1,699	8,446	4,33 ± 0,52	0,521 ± 0,067
12	75	1,875	4,961	7,37 ± 1,18	0,803 ± 0,079

\* Измерения проводились при длине волны поглощения  $\lambda_{ex} = 330$  нм, длина волны испускания составляла  $\lambda_{em} = 390$  нм. Во всех случаях: P = 0,05; n = 3.  
 $F_0$  – исходная интенсивность флуоресценции раствора белка; F – интенсивность флуоресценции раствора белка в присутствии антибиотика; [Q] – концентрация антибиотика

Таблица 31. Изучение тушения флуоресценции раствора казеината натрия рифапентином

№№	[Q], мкмоль/л	lg[Q]	F*, у.е.	$\frac{F_0^*}{F}$	$\lg \frac{F_0 - F}{F}$
1	0	-	995,496	-	-
2	5	0,699	678,766	1,47 ± 0,16	-0,332 ± 0,148
3	7,5	0,875	619,272	1,61 ± 0,16	-0,217 ± 0,113
4	10	1,000	557,437	1,79 ± 0,24	-0,105 ± 0,127
5	15	1,176	433,235	2,30 ± 0,06	0,113 ± 0,020
6	20	1,301	353,287	2,82 ± 0,08	0,260 ± 0,020
7	25	1,398	272,876	3,66 ± 0,57	0,423 ± 0,094
8	30	1,477	256,968	3,88 ± 0,61	0,459 ± 0,092
9	35	1,544	233,984	4,26 ± 0,33	0,513 ± 0,045
10	40	1,602	193,250	5,15 ± 0,27	0,618 ± 0,028
11	50	1,699	157,810	6,31 ± 0,46	0,725 ± 0,037
12	75	1,875	125,449	7,94 ± 0,27	0,841 ± 0,017

\* Измерения проводились при длине волны поглощения  $\lambda_{ex} = 295$  нм, длина волны испускания составляла  $\lambda_{em} = 350$  нм. Во всех случаях: P = 0,05; n = 3.  
 $F_0$  – исходная интенсивность флуоресценции раствора белка; F – интенсивность флуоресценции раствора белка в присутствии антибиотика; [Q] – концентрация антибиотика

Таблица 32. Изучение тушения флуоресценции раствора казеината натрия рифаксимином

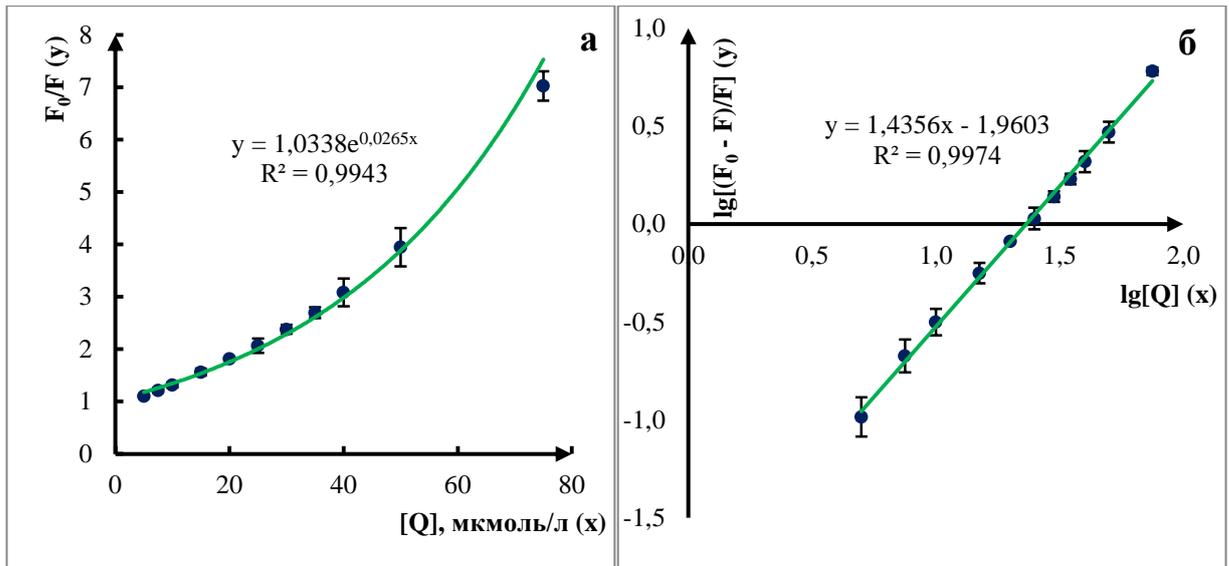
№№	[Q], мкмоль/л	lg[Q]	F*, у.е.	$\frac{F_0^*}{F}$	$\lg \frac{F_0 - F}{F}$
1	0	-	954,661	-	-
2	5	0,699	737,257	1,30 ± 0,05	-0,530 ± 0,080
3	7,5	0,875	709,411	1,35 ± 0,02	-0,462 ± 0,026
4	10	1,000	666,955	1,43 ± 0,10	-0,365 ± 0,094
5	15	1,176	560,760	1,71 ± 0,25	-0,153 ± 0,149
6	20	1,301	495,861	1,94 ± 0,47	-0,035 ± 0,215
7	25	1,398	437,299	2,22 ± 0,94	0,074 ± 0,326
8	30	1,477	397,947	2,43 ± 0,95	0,147 ± 0,285
9	35	1,544	344,535	2,85 ± 1,48	0,249 ± 0,388
10	40	1,602	284,077	3,37 ± 0,77	0,373 ± 0,144
11	50	1,699	247,873	3,86 ± 0,67	0,456 ± 0,100
12	75	1,875	211,676	4,52 ± 0,87	0,546 ± 0,108

\* Измерения проводились при длине волны поглощения  $\lambda_{ex} = 295$  нм, длина волны испускания составляла  $\lambda_{em} = 350$  нм. Во всех случаях: P = 0,05; n = 3.  
 $F_0$  – исходная интенсивность флуоресценции раствора белка; F – интенсивность флуоресценции раствора белка в присутствии антибиотика; [Q] – концентрация антибиотика

Полученные данные с высокой корреляцией ( $R^2 > 0,99$ ) описываются регрессионной зависимостью.

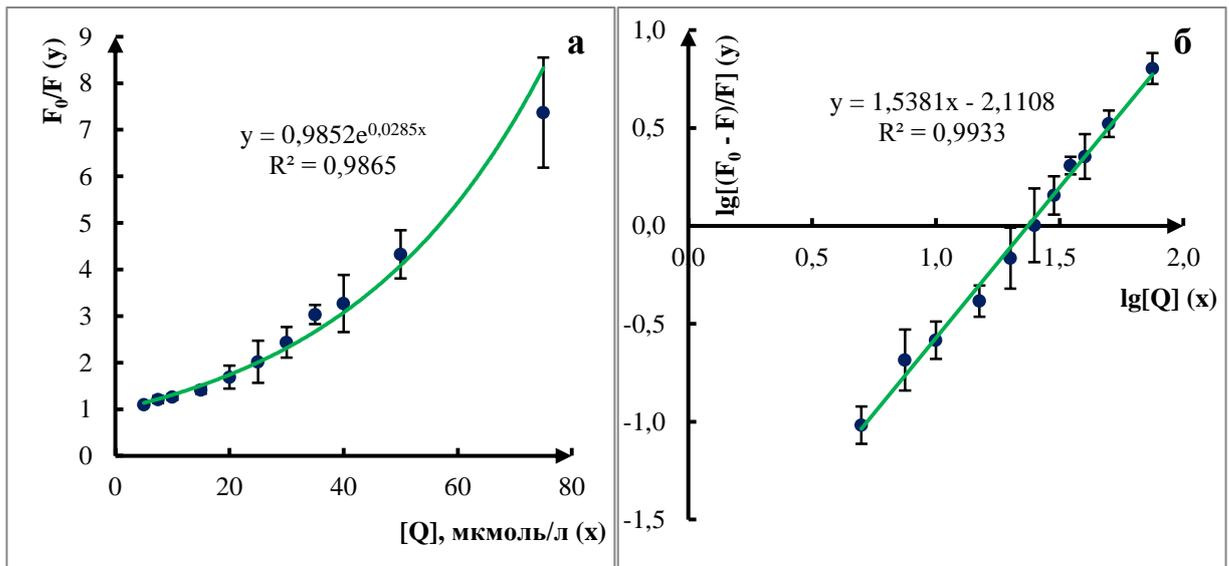
Интересно, что до молярного соотношения рифапентина и ЧСА менее 2:1 (точка 20 мкмоль/л, Рис. 19а, 20а), как и в случае с СЖ, начальный участок кривой оказывался линейным, соответствуя исходной модели Штерна-Фольмера. При большем же избытке рифапентина возникала нелинейная зависимость между тушением флуоресценции и концентрацией тушителя. Такой вид функции

говорит о смешанном характере тушения (статического и динамического), то есть в данном случае тушение, вероятно, происходит за счет образования комплекса и, отчасти, прочих факторов (например, теплового движения молекул или самотушения). В случае казеината натрия же, как для рифапентина, так и для рифаксимины, на всех участках наблюдается линейная зависимость (Рис. 21а, 22а).



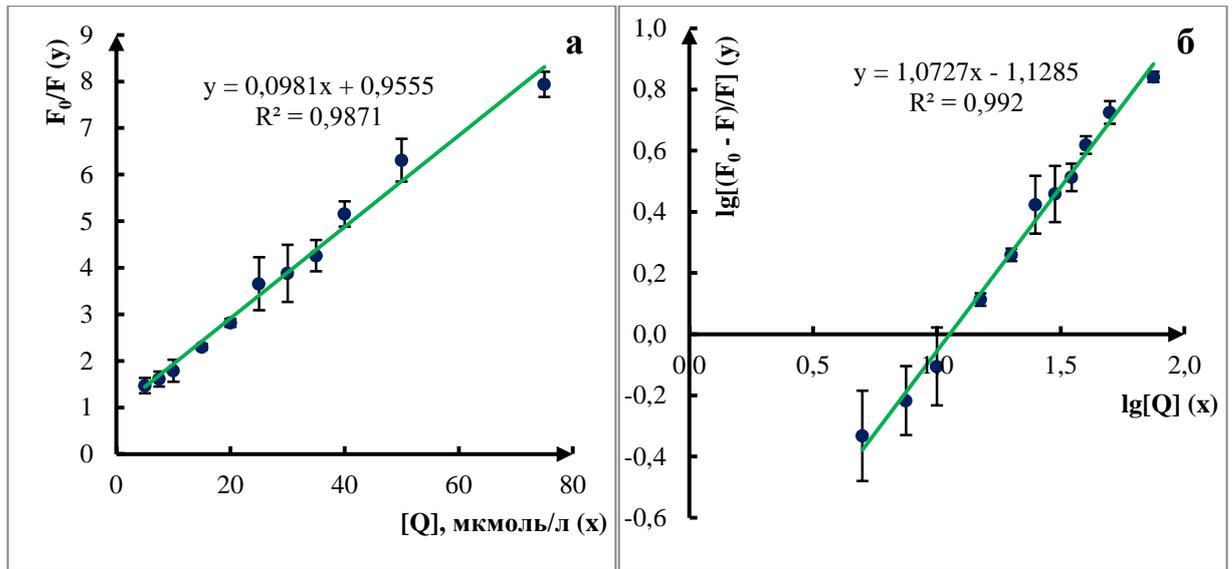
а – зависимость тушения от концентрации  
б – график для расчета константы ассоциации комплекса

Рисунок 19. Зависимость тушения флуоресценции человеческого сывороточного альбумина от концентрации рифапентина



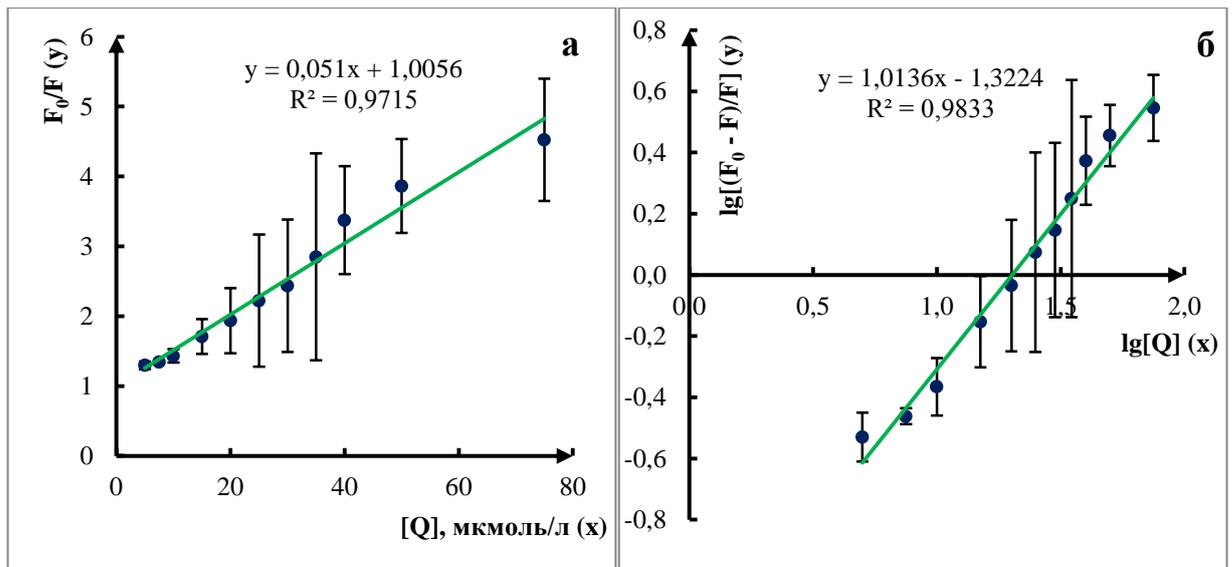
а – зависимость тушения от концентрации  
б – график для расчета константы ассоциации комплекса

Рисунок 20. Зависимость тушения флуоресценции сукцинированного желатина от концентрации рифапентина



а – зависимость тушения от концентрации  
 б – график для расчета константы ассоциации комплекса

Рисунок 21. Зависимость тушения флуоресценции казеината натрия от концентрации рифапентина



а – зависимость тушения от концентрации  
 б – график для расчета константы ассоциации комплекса

Рисунок 22. Зависимость тушения флуоресценции казеината натрия от концентрации рифаксимины

Были выполнены расчеты по уравнению (11) и установлены параметры связывания белков и антибиотиков. Экспериментальные данные приведены в Табл. 33.

Таблица 33. Параметры связывания антибиотиков с белками

Состав	Стехиометрия n	Константа ассоциации $K_A$ , л/моль
ЧСА-Рпт	$1,44 \pm 0,05$	$(0,92 \div 1,30) \times 10^4$
СЖ-Рпт	$1,54 \pm 0,10$	$(5,73 \div 10,48) \times 10^3$
КН-Рпт	$1,07 \pm 0,07$	$(5,92 \div 9,35) \times 10^4$
КН-Рфс	$1,01 \pm 0,10$	$(3,47 \div 6,53) \times 10^4$

Расчет по уравнению (11) для комплекса ЧСА-Рпт показывает, что  $K_A$  имеет порядок  $\sim 10^4$  л/моль. Для сравнения, комплексы ЧСА с экзогенными соединениями, характеризующиеся достаточно сильной связью, имеют порядок константы в области  $\sim 10^5$ - $10^7$  л/моль. Такие значения характерны, например, для варфарина, фенилбутазона, индометацина [140]. Таким образом, полученные данные говорят о взаимодействии средней силы между ЧСА и рифапентином.

Для рифамициновых антибиотиков характерна весьма высокая степень связывания с альбуминами в средах, близким к нейтральным. J.-D. Yang и соавторы показали, что метод тушения флуоресценции для исследования подобных взаимодействий чувствителен к концентрациям антибиотика  $\sim$  нг/мл. При этом за более сильное специфическое взаимодействие с рифамицинами отвечает остаток аминокислоты триптофана в молекуле белка. Образование комплекса с белком осуществляется посредством водородных связей, а также посредством сил Ван-дер-Ваальса и гидрофобных взаимодействий. С помощью квантовохимических расчетов авторы показали, что взаимодействие происходит между гидроксильными группами в составе алкильной цепи рифамицинов и карбонильной группой остатка триптофана. Кроме того, гидроксильные группы в составе нафталинового ядра рифамицинов взаимодействуют с аминогруппой в индольном кольце триптофана [142]. Восходящий нелинейный участок на кривой тушения флуоресценции может быть объяснен в этом отношении тем, что во взаимодействии с молекулой антибиотика участвуют сразу два остатка триптофана [143].

Полученные данные о взаимодействии белков и антибиотиков, в целом, согласуются с характеристиками получаемой водосовместимой формы. Так, в

случае рифаксимины ее вообще не удалось получить, используя ЧСА и СЖ, как и не удалось зарегистрировать тушение их флуоресценции рифаксимином. В случае рифапентина СЖ оказывался наихудшим с точки зрения стабильности системы, и содержание антибиотика в водной фазе оказывалось наименьшим, как оказалась наименьшей и соответствующая константа ассоциации.

Наиболее слабое взаимодействие, таким образом, оказывается между рифапентином и сукцинированным желатином, а наиболее сильное взаимодействие происходит с казеинатом натрия, как для рифапентина, так и для рифаксимины.

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

- На основании данных о тушении флуоресценции было установлено наличие взаимодействия между рифапентином и всеми тремя белками: ЧСА, СЖ, КН, и взаимодействие между рифаксимином и КН.
- Все комплексы антибиотиков с белками сравнительно непрочные, о чем говорят значения константы ассоциации  $\sim 10^3$ - $10^4$  л/моль.
- Наиболее сильное взаимодействие наблюдалось между рифапентином и казеинатом натрия, порядок константы был близок к 5.

### **3.5 Изучение эффективности водосовместимой формы рифапентина**

Исследование антибактериального эффекта инъекционной формы рифапентина в сравнении с субстанцией было проведено на модели острой туберкулезной инфекции у мышей с использованием заражающей дозы  $5,9 \times 10^6$  КОЕ/мышь. Это позволяет наблюдать генерализованный туберкулезный процесс с выраженными патологическими изменениями в легких, селезенке и печени экспериментальных животных. Модель острого туберкулеза соответствует международным требованиям и стабильно воспроизводится от эксперимента к эксперименту, поэтому широко применяется исследователями для определения чувствительности микобактерий к антибиотикам и эффективности противотуберкулезных препаратов и вакцин [165-168].

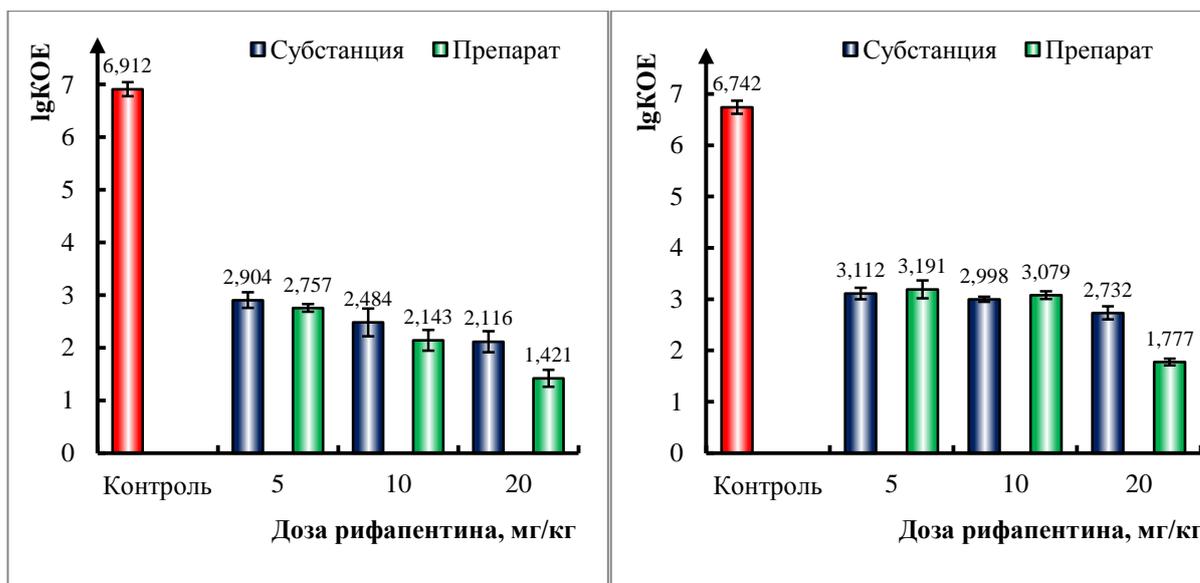
Для определения эффективности в отношении *M. tuberculosis* H37Rv субстанцию рифапентина вводили экспериментальным животным в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, равных лечебным дозам для человека, применяемым в клинической практике, 3 раза в неделю в течение 4 недель. Дозы и режим были выбраны на основании исследования, проведенного Rosenthal I.M. и соавторами на мышах с целью отработки режима комбинированной терапии туберкулеза с включением в схему лечения рифапентина [169]. Так как целью данного исследования не являлась установка оптимальной дозы и режима применения рифапентина в инъекционной форме, а необходимо было показать, что активность препарата сохраняется и при внутривенном введении, его использовали в тех же дозах и в том же режиме, что и субстанцию.

В Табл. 34 и на Рис. 23 представлены данные по содержанию микобактерий в органах экспериментальных животных.

Известно, что рифапентин обладает наивысшей активностью в отношении *M. tuberculosis* (МПК 0,06-0,25 мг/л) и наибольшим временем полужизни в плазме в сравнении с другими рифамицинами [170]. Например, через 48 ч после однократного перорального введения мышам рифапентина в диапазоне доз 7,5-20 мг/кг концентрации его в плазме крови превышают МПК более чем в 10 раз [171]. Следовательно, в условиях экспериментального лечения концентрация антибиотика превышала МПК в течение всего курса.

Таблица 34. Содержание микобактерий в органах мышей по окончании лечения

Доза, мг/кг	Количество микобактерий, КОЕ (log)					
	ЧСА-Рпт, в/в		Рпт, п/о		Контроль	
	легкие	селезенка	легкие	селезенка	легкие	селезенка
5	2,757 ± 0,075	3,191 ± 0,174	2,904 ± 0,149	3,112 ± 0,112	6,912 ± 0,131	6,742 ± 0,129
10	2,143 ± 0,197	3,079 ± 0,073	2,484 ± 0,264	2,998 ± 0,049		
20	1,421 ± 0,162	1,777 ± 0,066	2,116 ± 0,200	2,732 ± 0,129		
P = 0,05; n = 10.						



слева – легкие; справа – селезенка

Рисунок 23. Количество КОЕ (Ig) микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv, высеваемых из органов мышей через 35-38 суток после завершения лечения

Исходя из полученных экспериментальных данных (Табл. 34, Рис. 23), можно утверждать, что и инъекционная форма ЧСА-Рпт, и пероральная субстанция Рпт высокоэффективны в отношении *M. tuberculosis*: обсемененность легких и селезенки уменьшалась на 3-4 порядка. При этом зависимость эффекта от дозы была слабо выражена, хотя в единичных случаях у животных в легких отмечались лишь единичные микобактерии, в то время как в большинстве случаев высеваемость составляла  $\sim 10^2$  КОЕ. Полученные данные близки к результатам, полученным группой A. Lenaerts для пероральной формы рифапентина на модели острого туберкулезного процесса [172].

Таким образом, солюбилизация рифапентина с помощью ЧСА по предложенной технологии не приводит к снижению его эффективности. Это согласуется с данными, полученными при создании водорастворимых форм других антибиотиков при помощи ЧСА. Так, минимальная подавляющая концентрация олигосахаридных антибиотиков в композициях с ЧСА оставалась практически неизменной [173]. Повышение растворимости полиеновых макролидов методами твердой дисперсии с участием ЧСА не приводило к ослаблению их противогрибкового действия [174].

Более того, способность ЧСА проникать в клетки путем эндоцитоза в результате взаимодействия с гликопротеиновыми рецепторами (GP60) [175] позволяет осуществлять внутриклеточную доставку связанных с ним веществ. Несколько более высокую эффективность ЧСА-Рпт по сравнению с субстанцией Рпт, по-видимому, можно объяснить более высокой концентрацией препарата в клетках-мишенях (макрофагах), образующейся благодаря транспортной функции ЧСА. Косвенно это подтверждается на порядок меньшим количеством КОЕ в селезенке мышей, получавших ЧСА-Рпт в высокой дозе.

При вскрытии животных для оценки глубины протекания патологического процесса и эффективности лечения была проведена макроскопическая оценка состояния внутренних органов. В группе зараженных мышей, не получавших лечения, наблюдались характерные патологические изменения: увеличение объема селезенки, кровоизлияния и узлы в легких. В группах мышей, получавших внутривенную форму ЧСА-Рпт во всех изученных дозах, при визуальном осмотре изменений внутренних органов не обнаружено. У животных, получавших пероральную субстанцию, наблюдалось увеличение печени и желчного пузыря; интенсивность этих изменений зависела от дозы рифапентина, что, по-видимому, обусловлено его характерной токсичностью.

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

- С помощью разработанной технологии была получена водосовместимая форма рифапентина, проявившая высокую эффективность на модели острого туберкулеза у мышей.
- В дозах 5 и 10 мг/кг субстанция, введенная перорально, и внутривенная форма проявляли равную эффективность.
- В дозе 20 мг/кг внутривенная форма статистически значимо проявляла большую эффективность: 1,4/1,7 logКОЕ (легкие/селезенка) против 2,1/2,7 logКОЕ в случае перорально введенной субстанции.

Следует отметить, что, несмотря на отсутствие явного преимущества водосовместимой формы по эффективности, что можно объяснить неоптимальной дозой и режимом ее применения, внутривенное введение позволяет обеспечить

100% биодоступность рифапентина, исключить влияние приема пищи на фармакокинетику и уменьшить степень его метаболизма за счет возможного ослабления эффекта первого прохождения через печень. Внутривенная форма также может служить альтернативой пероральной, если использование последней вызывает сложности (рвота, неспособность глотать и т.д.). Кроме того, следует принять во внимание аспекты токсического действия, которые будут рассмотрены далее.

### **3.6 Токсикологическое исследование водосовместимой формы рифапентина**

#### **3.6.1 Острая токсичность**

Для исследования острой токсичности использовали парентеральную форму рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина. Среднее содержание рифапентина в препарате составляло  $9,86 \pm 0,31$  мг/мл, средний диаметр частиц суспензии составлял  $565 \pm 5$  нм, а индекс полидисперсности был равен  $0,208 \pm 0,023$ .

Коллоидную форму вводили однократно в хвостовую вену в диапазоне доз от 100 до 500 мг/кг. Полученные результаты представлены в Табл. 35 и на Рис. 24.

Таблица 35. Острая токсичность коллоидной формы рифапентина на мышах

<b>Доза, мг/кг</b>	<b>Количество животных: пало/всего в группе</b>	<b>Сроки гибели</b>
100	0/6	-
200	0/6	-
300	1/6	1 сутки
325	1/12	1 сутки
350	2/6	1 сутки
375	3/6	1 сутки
400	6/6	10 мин ÷ 1,5 ч
500	6/6	10 мин ÷ 1,5 ч

Внутривенное введение коллоидной формы рифапентина в смертельных дозах вызывало гибель животных в течение 10 минут ÷ 1,5 часов после инъекции. Более низкие дозы препарата приводили к гибели животных в течение 1 суток.

Можно предполагать, что при введении высоких доз причиной смерти животных является нейротоксичность, при применении более низких доз – сердечно-легочная недостаточность.

Расчетные дозы для внутривенной формы рифапентина составили:

ЛД<sub>50</sub> – 340,0 (308,9 ÷ 371,1) мг/кг

ЛД<sub>10</sub> – 273,3 мг/кг

ЛД<sub>16</sub> – 288,0 мг/кг

ЛД<sub>84</sub> – 392,1 мг/кг

ЛД<sub>100</sub> – 418,1 мг/кг

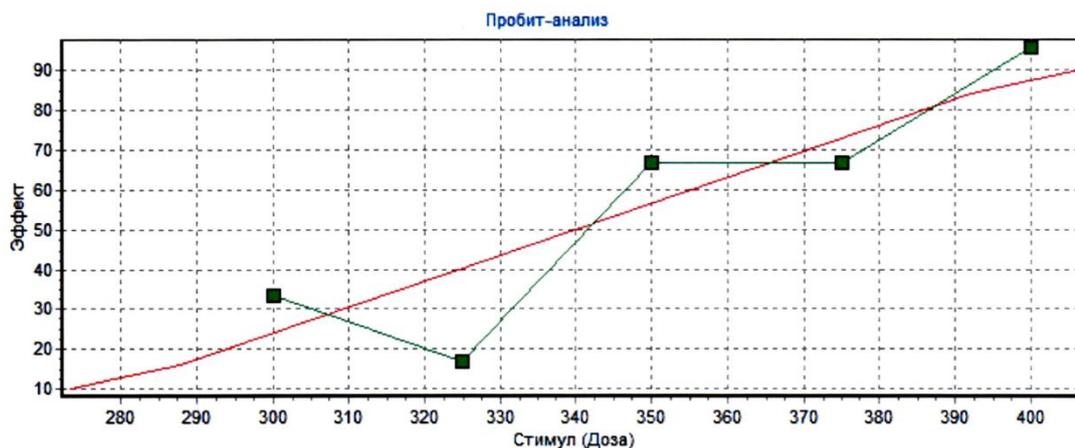


Рисунок 24. Зависимость процента павших животных от дозы внутривенной формы рифапентина

При пероральном введении субстанции рифапентина в диапазоне доз от 4000 до 14000 мг/кг гибели животных не отмечалось. В течение всего времени наблюдения за животными, получавшими субстанцию, никаких изменений в их поведении и состоянии не обнаружено. Полученные данные согласуются с данными литературы: для различных партий субстанции рифапентина значение ЛД<sub>50</sub> может колебаться от 3000 до 18000 мг/кг [125]. Это может быть обусловлено ее физико-химическими свойствами, зависящими от условий получения, а именно: степенью кристалличности и полиморфной модификацией, что оказывает влияние на скорость растворения и биодоступность [176, 177].

Таким образом, токсические дозы растворимой формы рифапентина при внутривенном введении, по крайней мере, на порядок выше токсических доз субстанции рифапентина при пероральном применении. При этом, в случае внутривенной формы диапазон токсических и переносимых доз весьма узок, однако, терапевтическая широта препарата достаточно велика, т.к. лечебная доза для мышей составляет 20 мг/кг.

### **3.6.2 Хроническая токсичность**

Для исследования хронической токсичности использовали серию препарата со средним содержанием рифапентина в суспензии  $5,53 \pm 0,15$  мг/мл, средним диаметром частиц суспензии  $517 \pm 8$  нм, индексом полидисперсности  $0,212 \pm 0,019$ . Для изучения токсических свойств плацебо крысам вводили лиофилизат человеческого сывороточного альбумина с маннитом (размер частиц около 10 нм) (ЧСА) в разовой дозе, эквивалентной дозе ЧСА, получаемой животными при введении водорастворимой лекарственной формы рифапентина в разовой дозе 11,53 мг/кг (суммарная ЛД<sub>50</sub>).

Было отмечено, что и субстанция рифапентина, и его коллоидная лекарственная форма хорошо переносились животными. В течение эксперимента ни в одной из групп не было отмечено гибели, отклонений в поведенческих реакциях, изменений состояния кожи и волосяного покрова. У крыс, получавших субстанцию рифапентина, видимые слизистые оболочки и подкожная жировая ткань окрашивались в желтый цвет. У крыс, получавших инъекционную форму препарата, видимые слизистые оболочки сохраняли бледно-розовую окраску, влажность их не изменялась, симптомы бронхита, конъюнктивита и ринита отсутствовали, что свидетельствует об отсутствии у препарата ярко выраженного общетоксического действия. Пятнадцатидневное введение препарата в испытанных дозах не оказывало статистически значимого влияния на потребление крысами корма и воды. Животные подопытных групп нормально прибавляли в массе тела (Табл. 36).

*Количественное исследование клеток периферической крови.* Клинический анализ крови животных подопытных групп не выявил статистически значимых различий по сравнению с контролем (Табл. 37-44). Количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, тромбоцитов, лейкоформула и величина гематокрита оставались в пределах физиологической нормы на протяжении всего эксперимента.

*Биохимическое исследование сыворотки крови.* При биохимическом исследовании сыворотки крови животных, получавших перорально субстанцию рифапентина, на 1 сутки по окончании курса введений было выявлено повышение содержания прямого и общего билирубина и щелочной фосфатазы, которое не зависело от дозы субстанции. Достоверное повышение уровня щелочной фосфатазы было отмечено и у животных, получавших коллоидную форму препарата в высокой дозе (Табл. 45). Через 15 суток после окончания введений биохимические показатели во всех подопытных группах возвращались к уровню контроля (Табл. 46).

*Суточный диурез и состав мочи.* При исследовании суточного диуреза и состава мочи различий между подопытными и контрольными группами не выявлено (Табл. 47-48).

*Сердечно-сосудистая система.* Анализ показателей электрокардиограммы животных подопытных групп показал, применение рифапентина как в субстанции, так и в коллоидной лекарственной форме не оказывает влияния на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Все изученные показатели находились в пределах физиологической нормы (Табл. 49-50).

*Массовые коэффициенты внутренних органов.* Во всех подопытных группах на 1 сутки после курса введений препаратов было выявлено увеличение МК почки и селезенки, на 15 сутки после курса – увеличение МК печени. Остальные показатели на оба срока исследования не отличались от контроля (Табл. 51-52).

Таблица 36. Динамика массы тела (г) крыс в хроническом эксперименте

Группа	Значение	Сутки эксперимента						
		0	5	10	15	5 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>175</b>	<b>209</b>	<b>238</b>	<b>253</b>	<b>293</b>	<b>324</b>	<b>302</b>
	S	19	24	22	27	30	29	31
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>178</b>	<b>212</b>	<b>246</b>	<b>259</b>	<b>293</b>	<b>324</b>	<b>307</b>
	S	12	15	23	27	29	38	34
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>178</b>	<b>209</b>	<b>244</b>	<b>256</b>	<b>305</b>	<b>333</b>	<b>313</b>
	S	12	14	19	20	29	33	31
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>176</b>	<b>208</b>	<b>234</b>	<b>251</b>	<b>295</b>	<b>321</b>	<b>302</b>
	S	13	14	16	21	31	32	32
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>190</b>	<b>201</b>	<b>230</b>	<b>247</b>	<b>275</b>	<b>295</b>	<b>290</b>
	S	25	20	26	25	31	33	37
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>185</b>	<b>195</b>	<b>225</b>	<b>241</b>	<b>261</b>	<b>285</b>	<b>279</b>
	S	19	17	21	22	25	20	25

Таблица 37. Общее количество лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>11,68</b>	<b>13,69</b>	<b>10,44</b>	<b>12,91</b>	<b>12,23</b>	<b>14,09</b>	<b>12,78</b>	<b>10,20</b>
	S	1,08	3,98	1,83	0,76	0,74	4,23	0,56	1,74
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>11,90</b>	<b>14,35</b>	<b>11,55</b>	<b>12,39</b>	<b>12,89</b>	<b>11,91</b>	<b>11,49</b>	<b>9,14</b>
	S	0,98	3,53	4,13	1,08	0,85	2,01	1,03	1,61
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>11,96</b>	<b>13,32</b>	<b>11,04</b>	<b>11,98</b>	<b>10,90</b>	<b>13,11</b>	<b>11,61</b>	<b>9,27</b>
	S	1,60	3,78	3,90	1,52	0,66	2,33	0,73	1,83
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>11,52</b>	<b>11,49</b>	<b>12,66</b>	<b>9,14</b>	<b>9,81</b>	<b>16,72</b>	<b>8,95</b>	<b>8,61</b>
	S	2,78	2,87	6,34	1,35	0,81	4,75	1,55	0,11
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>9,91</b>	<b>13,69</b>	<b>13,74</b>	<b>9,51</b>	<b>9,87</b>	<b>12,48</b>	<b>10,65</b>	<b>8,33</b>
	S	1,52	3,87	4,54	1,48	0,51	2,99	0,98	1,85
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>10,45</b>	<b>13,53</b>	<b>12,67</b>	<b>9,15</b>	<b>10,16</b>	<b>13,42</b>	<b>9,96</b>	<b>8,63</b>
	S	1,71	3,50	2,30	0,44	0,80	3,09	2,29	1,60

Таблица 38. Абсолютное количество лимфоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>9,38</b>	<b>11,29</b>	<b>7,60</b>	<b>10,88</b>	<b>9,93</b>	<b>11,49</b>	<b>10,30</b>	<b>8,30</b>
	S	0,76	4,85	0,88	0,98	0,86	4,29	0,89	1,14
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>10,08</b>	<b>12,39</b>	<b>9,50</b>	<b>10,04</b>	<b>11,12</b>	<b>9,95</b>	<b>9,34</b>	<b>6,98</b>
	S	0,80	2,99	3,37	1,52	0,84	1,72	1,37	1,74
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>10,09</b>	<b>11,59</b>	<b>9,24</b>	<b>10,03</b>	<b>9,07</b>	<b>11,44</b>	<b>9,76</b>	<b>7,32</b>
	S	1,57	3,89	3,82	1,70	1,09	2,09	0,85	1,26
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>9,72</b>	<b>9,80</b>	<b>10,92</b>	<b>7,01</b>	<b>8,19</b>	<b>15,32</b>	<b>7,19</b>	<b>6,63</b>
	S	3,30	2,88	5,94	1,47	0,51	4,54	1,78	0,11
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>7,74</b>	<b>11,00</b>	<b>11,38</b>	<b>7,12</b>	<b>8,01</b>	<b>10,42</b>	<b>8,55</b>	<b>6,02</b>
	S	1,26	3,92	4,59	1,84	1,01	3,49	0,69	1,43
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>8,39</b>	<b>11,73</b>	<b>10,16</b>	<b>6,86</b>	<b>8,17</b>	<b>11,47</b>	<b>7,54</b>	<b>6,27</b>
	S	1,36	3,77	1,57	0,92	1,08	3,43	2,89	1,48

Таблица 39. Абсолютное количество моноцитов, эозинофилов и базофилов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,51</b>	<b>0,44</b>	<b>0,88</b>	<b>0,68</b>	<b>0,54</b>	<b>0,52</b>	<b>0,61</b>	<b>0,39</b>
	S	0,10	0,37	0,49	0,27	0,14	0,17	0,21	0,36
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,38</b>	<b>0,38</b>	<b>0,71</b>	<b>0,42</b>	<b>0,49</b>	<b>0,42</b>	<b>0,60</b>	<b>0,67</b>
	S	0,12	0,13	0,56	0,15	0,20	0,41	0,32	0,54
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,60</b>	<b>0,28</b>	<b>0,52</b>	<b>0,54</b>	<b>0,55</b>	<b>0,51</b>	<b>0,47</b>	<b>0,55</b>
	S	0,33	0,19	0,47	0,22	0,34	0,61	0,18	0,39
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,73</b>	<b>0,84</b>	<b>0,51</b>	<b>0,74</b>	<b>0,60</b>	<b>0,56</b>	<b>0,75</b>	<b>0,71</b>
	S	0,13	0,47	0,37	0,11	0,12	0,26	0,23	0,08
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>0,62</b>	<b>0,80</b>	<b>0,72</b>	<b>0,61</b>	<b>0,60</b>	<b>0,48</b>	<b>0,72</b>	<b>0,58</b>
	S	0,22	0,53	0,56	0,12	0,23	0,34	0,19	0,32
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>0,53</b>	<b>0,42</b>	<b>0,73</b>	<b>0,60</b>	<b>0,48</b>	<b>0,51</b>	<b>0,56</b>	<b>0,81</b>
	S	0,22	0,35	0,44	0,24	0,26	0,38	0,32	0,37

Таблица 40. Абсолютное количество гранулоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>1,79</b>	<b>1,96</b>	<b>1,96</b>	<b>1,35</b>	<b>1,76</b>	<b>2,08</b>	<b>1,87</b>	<b>1,51</b>
	S	0,81	0,79	0,50	0,31	0,53	0,82	0,91	0,47
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>1,44</b>	<b>1,59</b>	<b>1,34</b>	<b>1,93</b>	<b>1,28</b>	<b>1,53</b>	<b>1,54</b>	<b>1,49</b>
	S	0,34	0,86	0,64	0,77	0,70	0,69	0,64	0,27
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>1,28</b>	<b>1,45</b>	<b>1,28</b>	<b>1,42</b>	<b>1,28</b>	<b>1,17</b>	<b>1,38</b>	<b>1,39</b>
	S	0,51	0,29	0,48	0,46	0,40	0,51	0,43	0,58
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>1,07</b>	<b>0,85</b>	<b>1,23</b>	<b>1,39</b>	<b>1,01</b>	<b>0,84</b>	<b>1,01</b>	<b>1,27</b>
	S	0,54	0,50	0,57	0,21	0,43	0,17	0,31	0,02
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>1,55</b>	<b>1,90</b>	<b>1,63</b>	<b>1,78</b>	<b>1,25</b>	<b>1,58</b>	<b>1,38</b>	<b>1,72</b>
	S	0,64	0,44	0,25	0,72	0,52	0,78	0,61	0,40
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>1,53</b>	<b>1,38</b>	<b>1,77</b>	<b>1,69</b>	<b>1,50</b>	<b>1,44</b>	<b>1,86</b>	<b>1,55</b>
	S	0,50	0,65	0,63	0,49	0,65	0,42	0,57	0,29

Таблица 41. Общее количество эритроцитов ( $\times 10^{12}/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>8,61</b>	<b>9,19</b>	<b>7,76</b>	<b>8,37</b>	<b>9,38</b>	<b>10,07</b>	<b>8,86</b>	<b>8,35</b>
	S	0,54	0,22	0,67	0,73	0,52	1,39	0,55	0,42
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>9,23</b>	<b>10,00</b>	<b>7,85</b>	<b>9,06</b>	<b>8,94</b>	<b>9,83</b>	<b>9,27</b>	<b>8,57</b>
	S	0,45	1,07	0,44	1,26	1,04	0,93	0,72	0,57
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>9,17</b>	<b>9,51</b>	<b>7,92</b>	<b>8,35</b>	<b>7,97</b>	<b>9,57</b>	<b>9,87</b>	<b>8,57</b>
	S	0,67	0,89	1,81	0,87	0,74	0,97	0,75	0,52
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>7,81</b>	<b>9,56</b>	<b>8,35</b>	<b>8,26</b>	<b>8,95</b>	<b>10,14</b>	<b>8,63</b>	<b>7,99</b>
	S	0,90	0,69	0,60	0,60	0,89	0,85	0,52	0,04
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>8,66</b>	<b>9,80</b>	<b>8,45</b>	<b>8,55</b>	<b>9,56</b>	<b>10,60</b>	<b>8,22</b>	<b>8,17</b>
	S	0,75	0,82	0,76	0,75	0,61	1,25	1,01	0,46
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>9,48</b>	<b>9,01</b>	<b>8,95</b>	<b>9,12</b>	<b>8,79</b>	<b>10,66</b>	<b>9,02</b>	<b>8,31</b>
	S	0,74	0,70	0,71	0,67	0,81	0,77	0,57	0,51

Таблица 42. Содержание гемоглобина (г/л) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	169	182	148	155	159	196	176	156
	S	21	26	10	9	14	28	14	5
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	157	210	149	146	136	178	151	160
	S	14	34	5	10	8	30	4	11
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	182	192	140	166	177	184	180	155
	S	13	25	26	14	14	14	12	3
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	164	194	131	172	169	194	141	150
	S	18	19	27	22	26	20	13	1
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	167	193	155	177	185	205	190	155
	S	20	10	11	17	14	16	19	7
№ 6: контроль	$\bar{X}$	171	178	158	168	170	206	180	154
	S	15	10	5	21	19	17	16	12

Таблица 43. Показатель гематокрита (%) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	45,50	46,59	40,71	46,55	46,11	50,85	45,71	43,77
	S	1,12	1,72	3,39	1,65	1,70	7,13	2,03	1,77
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	47,18	48,81	41,21	44,56	42,97	49,90	46,05	43,99
	S	1,62	5,80	1,35	1,94	0,58	5,94	3,62	3,95
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	42,03	49,01	39,45	43,50	45,03	47,80	42,46	43,59
	S	1,76	6,61	9,39	4,49	2,80	3,85	1,90	1,70
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	43,38	45,97	40,93	44,21	46,13	47,73	45,87	40,95
	S	2,49	4,40	2,81	4,08	2,16	6,43	2,48	0,38
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	42,89	45,55	42,63	42,68	44,10	47,84	40,05	43,57
	S	3,35	3,92	3,03	1,37	2,31	6,55	1,86	1,59
№ 6: контроль	$\bar{X}$	47,21	44,87	45,40	45,27	46,19	48,14	47,43	43,65
	S	2,20	3,41	2,66	1,00	2,05	5,29	1,42	2,95

Таблица 44. Количество тромбоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс

Группа	Значение	Сутки эксперимента							
		0	7	15	3 п.к.	5 п.к.	7 п.к.	10 п.к.	15 п.к.
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	637	555	424	498	611	533	523	498
	S	147	224	77	107	110	183	116	201
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	550	635	496	572	570	503	633	554
	S	125	158	54	91	104	220	119	130
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	599	496	731	611	537	659	532	510
	S	188	59	353	116	129	179	139	127
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	611	576	589	487	571	595	499	507
	S	138	213	131	128	108	103	70	21
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	517	605	551	651	725	836	673	641
	S	96	137	53	154	132	194	115	107
№ 6: контроль	$\bar{X}$	586	741	616	535	555	825	571	511
	S	106	159	83	113	105	201	85	119

Таблица 45. Биохимические показатели сыворотки крови крыс на 1 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель									
		АСТ ед./л	АЛТ ед./л	Альбумин г/л	Билирубин общий мкмоль/л	Билирубин прямой мкмоль/л	Креатинин мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Общий белок г/л	ЩФ ед./л	Глюкоза ммоль/л
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	166,8	57,1	33,2	6,7	6,7	19,0	3,12	63,7	426,2	5,4
	S	23,8	13,9	2,3	1,1	1,3	5,1	1,10	2,4	126,4	0,5
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	186,0	68,6	32,8	6,6	8,0	16,6	2,55	65,1	*428,0	4,6
	S	50,5	7,7	0,7	3,3	2,0	4,6	0,90	1,9	75,1	0,3
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	214,7	61,9	34,0	*14,7	*13,8	11,5	3,79	64,7	*563,1	5,6
	S	28,5	13,4	1,4	2,2	2,0	3,4	1,01	3,7	79,3	1,2
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	201,0	69,8	34,2	*19,4	*16,8	14,2	4,20	66,3	*539,1	5,5
	S	22,7	5,5	2,3	3,6	2,2	3,8	0,75	3,5	42,1	0,7
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	154,7	49,8	34,6	2,9	5,6	22,4	1,52	71,0	242,0	5,7
	S	23,1	11,5	1,1	2,0	1,6	5,2	1,26	4,8	66,4	0,5
№ 6: контроль	$\bar{X}$	177,5	68,2	35,5	6,2	9,6	30,1	3,56	72,1	302,1	6,0
	S	26,7	16,4	1,5	1,9	2,6	5,5	1,12	1,7	41,6	0,5

Таблица 46. Биохимические показатели сыворотки крови крыс на 15 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель									
		АСТ ед./л	АЛТ ед./л	Альбумин г/л	Билирубин общий мкмоль/л	Билирубин прямой мкмоль/л	Креатинин мкмоль/л	Мочевина ммоль/л	Общий белок г/л	ЩФ ед./л	Глюкоза ммоль/л
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	151,2	72,4	34,0	6,1	1,9	37,1	4,46	71,7	400,1	7,0
	S	47,3	26,2	2,8	0,5	0,8	7,9	0,57	6,8	64,5	0,8
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	178,4	66,3	34,0	5,7	0,2	38,8	2,07	70,4	322,0	8,1
	S	25,5	14,2	1,2	0,9	0,3	10,2	1,98	5,1	141,6	4,3
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	176,6	58,3	35,3	6,0	1,0	39,8	2,29	72,1	357,0	9,4
	S	26,5	19,9	1,7	1,4	1,5	11,2	2,58	1,9	148,9	3,6
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	203,6	59,4	32,6	5,9	2,5	42,1	5,87	70,1	290,3	7,5
	S	50,8	7,4	2,8	1,4	1,8	6,8	2,13	4,4	52,3	2,2
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	186,1	45,6	31,8	7,6	0,5	28,9	5,14	72,6	220,8	6,6
	S	48,6	11,4	1,1	1,7	0,5	8,1	2,73	5,0	56,3	0,6
№ 6: контроль	$\bar{X}$	213,9	54,1	34,6	7,6	2,7	35,5	4,26	73,9	208,2	10,3
	S	20,5	10,4	2,4	1,2	2,6	11,4	1,98	3,8	44,8	3,5

Таблица 47. Суточный диурез и клинический анализ мочи крыс на 1 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель										
		Выпито, мл	Выделено, мл	Эритроциты, шт./мкл	Лейкоциты, шт./мкл	Билирубин	Уробилиноген, мкмоль/л	Кетоны, ммоль/л	Глюкоза	pH	Белок, г/л	Удельный вес
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	13,8	12,9	-	0-25	-	-	0-0,5	-	6,5	0,6	1,015
	S	3,9	5,9							0,0	0,4	0,008
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	16,5	14,9	-	0-25	-	-	-	-	6,5	0,7	1,014
	S	3,4	8,0							0,0	0,4	0,012
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	12,0	10,8	-	0-75	-	-	0-0,5	-	6,5	0,6	1,019
	S	2,9	3,2							0,0	0,4	0,007
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	14,5	11,3	-	0-25	-	-	0-1,5	-	6,5	0,5	1,011
	S	2,1	2,6							0,0	0,4	0,006
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	15,8	11,2	-	-	-	-	-	-	6,5	0,5	1,010
	S	3,5	3,4							0,0	0,4	0,005
№ 6: контроль	$\bar{X}$	16,2	14,3	-	-	-	-	-	-	6,5	0,3	1,011
	S	2,7	3,2							0,0	0,0	0,004

Таблица 48. Суточный диурез и клинический анализ мочи крыс на 15 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель										
		Выпито, мл	Выделено, мл	Эритроциты, шт./мкл	Лейкоциты, шт./мкл	Билирубин	Уробилиноген, мкмоль/л	Кетоны, ммоль/л	Глюкоза	pH	Белок, г/л	Удельный вес
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	17,1	15,9	-	-	-	-	0-0,5	-	6,5	0,4	1,013
	S	2,1	2,0	-	-	-	-	0-0,5	-	0,0	0,3	0,009
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	17,5	15,8	-	-	-	-	0-0,5	-	6,5	0,5	1,017
	S	3,9	2,7	-	-	-	-	0-0,5	-	0,0	0,4	0,012
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	16,6	12,6	-	-	-	-	0-0,5	-	6,6	0,4	1,013
	S	3,4	4,1	-	-	-	-	0-0,5	-	0,2	0,3	0,008
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	15,5	13,6	-	-	-	-	0-0,5	-	6,6	0,4	1,012
	S	2,4	2,8	-	-	-	-	0-0,5	-	0,2	0,3	0,008
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	15,8	13,2	-	-	-	-	0-0,5	-	6,5	0,4	1,016
	S	3,2	3,0	-	-	-	-	0-0,5	-	0,0	0,3	0,010
№ 6: контроль	$\bar{X}$	16,6	13,6	-	-	-	-	0-0,5	-	6,5	0,6	1,015
	S	3,9	3,1	-	-	-	-	0-0,5	-	0,0	0,4	0,004

Таблица 49. Показатели электрокардиограммы крыс на 1 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель			
		R-R, с	QT, с	QT%	ЧСС, уд/мин
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,128</b>	<b>0,050</b>	<b>39</b>	<b>471</b>
	S	0,008	0,000	3	30
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,140</b>	<b>0,048</b>	<b>35</b>	<b>432</b>
	S	0,014	0,004	5	44
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,136</b>	<b>0,050</b>	<b>37</b>	<b>444</b>
	S	0,011	0,000	3	38
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,136</b>	<b>0,050</b>	<b>37</b>	<b>443</b>
	S	0,009	0,000	2	28
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>0,136</b>	<b>0,054</b>	<b>40</b>	<b>445</b>
	S	0,013	0,005	6	44
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>0,158</b>	<b>0,052</b>	<b>33</b>	<b>383</b>
	S	0,016	0,004	3	39

Таблица 50. Показатели электрокардиограммы крыс на 15 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель			
		R-R, с	QT, с	QT%	ЧСС, уд/мин
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,132</b>	<b>0,048</b>	<b>36</b>	<b>454</b>
	S	0,008	0,004	4	27
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,138</b>	<b>0,050</b>	<b>37</b>	<b>443</b>
	S	0,020	0,000	6	64
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,130</b>	<b>0,050</b>	<b>39</b>	<b>462</b>
	S	0,013	0,000	4	50
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,158</b>	<b>0,050</b>	<b>32</b>	<b>382</b>
	S	0,016	0,000	3	41
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>0,160</b>	<b>0,048</b>	<b>31</b>	<b>385</b>
	S	0,030	0,001	6	66
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>0,166</b>	<b>0,047</b>	<b>28</b>	<b>364</b>
	S	0,015	0,003	4	34

Таблица 51. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс на 1 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель				
		Тимус, масс.%	Сердце, масс.%	Селезенка, масс.%	Почка, масс.%	Печень, масс.%
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,30</b>	<b>0,38</b>	<b>*0,36</b>	<b>*0,36</b>	<b>3,23</b>
	S	0,06	0,05	0,04	0,02	0,25
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,31</b>	<b>0,38</b>	<b>*0,43</b>	<b>*0,34</b>	<b>3,24</b>
	S	0,06	0,06	0,07	0,02	0,23
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,25</b>	<b>0,37</b>	<b>*0,48</b>	<b>*0,36</b>	<b>3,32</b>
	S	0,04	0,04	0,09	0,03	0,21
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,29</b>	<b>0,38</b>	<b>*0,42</b>	<b>*0,35</b>	<b>3,38</b>
	S	0,05	0,02	0,06	0,02	0,16
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>0,25</b>	<b>0,32</b>	<b>0,29</b>	<b>0,31</b>	<b>2,85</b>
	S	0,04	0,03	0,06	0,01	0,16
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>0,22</b>	<b>0,32</b>	<b>0,26</b>	<b>0,29</b>	<b>2,84</b>
	S	0,03	0,04	0,05	0,02	0,29

Таблица 52. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс на 15 сутки после курса

Группа	Значение	Показатель				
		Тимус, масс.%	Сердце, масс.%	Селезенка, масс.%	Почка, масс.%	Печень, масс.%
№ 1: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,19</b>	<b>0,32</b>	<b>0,27</b>	<b>0,30</b>	<b>*2,74</b>
	S	0,07	0,02	0,06	0,02	0,09
№ 2: в/б ЧСА-Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,20</b>	<b>0,31</b>	<b>0,30</b>	<b>0,34</b>	<b>*2,77</b>
	S	0,05	0,05	0,05	0,12	0,22
№ 3: п/о Рпт; 1/15 МПД	$\bar{X}$	<b>0,19</b>	<b>0,33</b>	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>	<b>*2,79</b>
	S	0,05	0,02	0,06	0,01	0,23
№ 4: п/о Рпт; 1/15 ЛД <sub>50</sub>	$\bar{X}$	<b>0,16</b>	<b>0,31</b>	<b>0,31</b>	<b>0,30</b>	<b>*2,72</b>
	S	0,03	0,04	0,04	0,02	0,21
№ 5: в/б ЧСА	$\bar{X}$	<b>0,16</b>	<b>0,28</b>	<b>0,27</b>	<b>0,26</b>	<b>2,44</b>
	S	0,04	0,03	0,04	0,02	0,16
№ 6: контроль	$\bar{X}$	<b>0,13</b>	<b>0,29</b>	<b>0,23</b>	<b>0,27</b>	<b>2,31</b>
	S	0,03	0,04	0,02	0,02	0,07

*Патоморфологическое исследование.* Результаты патоморфологического исследования внутренних органов крыс, получавших в хроническом эксперименте субстанцию (Рпт) и водосовместимую лекарственную форму (ЧСА-Рпт) рифапентина, систематизированы в Табл. 53. Микрофотографии, иллюстрирующие найденные изменения структуры органов и тканей, представлены в Приложении А.

Таблица 53. Патоморфологические изменения внутренних органов крыс

Препарат	Доза	Срок наблюдения		Срок наблюдения	
		Количество животных с патологией из 5 в группе	1 сутки после курса	Количество животных с патологией из 5 в группе	15 сутки после курса
1	2	3	4	5	6
<b>Сердце</b>					
<b>Контроль</b>	-	Умеренное полнокровие капилляров миокарда (Фото 1)*.			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	3	Умеренный очаговый отек интерстиция, небольшие очаги токсической кардиомиопатии, единичные мелкие очаги деструкции кардиомиоцитов (Фото 2), лимфогистиоцитарные инфильтраты под перикардом и эндокардом (Фото 3).	2	Единичные мелкие очаги некроза кардиомиоцитов вокруг артерий (Фото 4) и под эндокардом.
	$\Sigma$ МПД	1	Единичные мелкие очаги токсической кардиомиопатии, умеренный очаговый отек интерстиция.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	1	Умеренный очаговый отек миокарда, единичные мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты под перикардом.	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>Печень</b>					
<b>Контроль</b>	-	Балочная структура не изменена, вблизи центральных вен и портальных трактов – единичные мелкие лимфоидные инфильтраты (Фото 5).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Множественные очаги микронекроза различных размеров, расположенные вблизи портальных трактов, порто-портально и порто-центрально (Фото 6), вокруг отдельных триад – некроз краевой пластинки, вокруг отдельных центральных вен – умеренный отек.	5	Множественные очаги микронекроза, часть из которых – в стадии организации (Фото 7).
	$\Sigma$ МПД	5	Единичные очаги микронекроза вблизи триад и между триадами и центральными венами (Фото 8).	5	Изменения такие же, как на 1 сутки.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе (Фото 9, 10). Активация купферовских клеток.	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе. Активация купферовских клеток.
	$\Sigma$ МПД	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе (Фото 9, 10). Активация купферовских клеток.	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе. Активация купферовских клеток.
* Фотографии приводятся в Приложении А.					

Продолжение Таблицы 53

1	2	3	4	5	6
<b>Почка</b>					
<b>Контроль</b>	-	Структура клубочкового и канальцевого аппарата без особенностей, слабый периваскулярный отек в юкстамедуллярной зоне (Фото 11).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	3	Умеренный, иногда – сильный, периваскулярный отек, умеренный очаговый отек интерстиция, единичные мелкие очаги некроза извитых канальцев вблизи сосудов корковой (Фото 12) и юкстамедуллярной зон (Фото 13), в просвете дистальных канальцев юкстамедуллярной зоны – белковые массы.	1	В юкстамедуллярной зоне крупный очаг некроза извитых канальцев с признаками организации (Фото 14).
	$\Sigma$ МПД	5	Умеренный периваскулярный отек в юкстамедуллярной зоне.	5	Умеренный периваскулярный отек в юкстамедуллярной зоне.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	2	Отек и повреждения канальцев такие же, как у животных, получавших Рпт в эквитоксической дозе (Фото 15). Изменения структуры клубочков: просвет капсулы клубочков юкстамедуллярной зоны расширен; под капсулой отдельных клубочков – отложения белковых масс (Фото 16); в единичных клубочках – очаговая атрофия капиллярной сети (Фото 17).	1	Множественные мелкие очаги некроза извитых канальцев с признаками организации, утолщение париетального листка капсулы отдельных клубочков, единичные рубцующиеся клубочки (Фото 18).
				1	В юкстамедуллярной зоне – обширный очаг некроза извитых канальцев в стадии организации (Фото 19).
	$\Sigma$ МПД	2	Умеренный периваскулярный отек в юкстамедуллярной зоне, в клубочках – расширение просвета капсулы, вакуолизация эндотелия капилляров (Фото 20).	0	Изменений не выявлено.
<b>Легкие</b>					
<b>Контроль</b>	-	Умеренное полнокровие сосудов, небольшие периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты (Фото 21).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	На отдельных участках ткани легкого – умеренное очаговое утолщение альвеолярных перегородок, связанное с активацией альвеолоцитов II порядка, умеренная очаговая или диффузная лимфогистиоцитарная инфильтрация периваскулярных и перибронхиальных пространств (Фото 22).	5	Очаговое утолщение альвеолярных перегородок.
				2	В области утолщения альвеолярных перегородок – множественные мелкие очаги фиброза (Фото 23).
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе. Просвет отдельных альвеол заполнен ксантомными клетками (Фото 24).	5	Пакеты лимфоидных фолликулов с центрами размножения вокруг крупных бронхиол. На отдельных участках лимфоидная ткань замещает мышечную оболочку бронха и располагается прямо под эпителиальной выстилкой, вызывая ее десквамацию и слушивание лимфоцитов и погибших клеток в просвет бронха (Фото 25). Единичные мелкие очаги фиброза в зонах утолщения альвеолярных перегородок.
				1	Очаг фиброза плевры и легочной ткани под ней.
				1	Крупный очаг фиброза в ткани легкого (Фото 26)
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	1	Лимфогистиоцитарные инфильтраты средних размеров вблизи крупных бронхиол.

Продолжение Таблицы 53

1	2	3	4	5	6
<b>Селезенка</b>					
<b>Контроль</b>	-	Умеренное полнокрое, лимфоидные фолликулы крупные, иногда – неправильной формы, в отдельных фолликулах встречаются центры размножения (Фото 27).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Умеренная атрофия лимфоидной ткани, которая выражается в уменьшении размеров части фолликулов (Фото 28). В красной пульпе на фоне умеренного полнокроя – множественные очаги экстрамедуллярного кроветворения, повышенное содержание мегакариоцитов и мегакариобластов (Фото 29).	5	Фолликулы средних размеров, правильной формы (Фото 30), иногда – с центрами размножения.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе.	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>Лимфоузел</b>					
<b>Контроль</b>	-	Лимфоидные фолликулы мелкие, иногда – с центрами размножения (Фото 31).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Умеренная, иногда – глубокая, атрофия лимфоидной ткани в части лимфоидных фолликулов и интерфолликулярной зоне (Фото 32).	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Изменения такие же, как при введении субстанции в эквитоксической дозе.	5	Умеренная атрофия лимфоидной ткани в отдельных фолликулах, венулы с высоким эндотелием в корковой и мозговой зонах, обилие макрофагов в синусах (Фото 33), центры размножения в части фолликулов (Фото 34).
				2	Небольшие очаги фиброза стромы в мозговой зоне и под капсулой корковой (Фото 35).
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>Поджелудочная железа</b>					
<b>Контроль</b>	-	Гистологическое строение без особенностей (Фото 58).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Полнокровие капилляров экзокринной части железы, очаги некроза ацинусов вблизи сосудов и протоков (Фото 59). Резкое расширение просвета капилляров, деструкция отдельных $\beta$ -клеток или их небольших групп в островках Лангерганса (Фото 60).	5	Единичные мелкие очаги некроза ацинусов.
				1	Крупный очаг некроза в стадии организации, распространяющийся на всю дольку (Фото 61). Размеры отдельных островков резко увеличены.
	$\Sigma$ МПД	3	Единичные мелкие очаги некроза в экзокринной части железы (Фото 63), Полнокровие капилляров в островках Лангерганса.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Изменения такие же, как при применении Рпт в эквитоксической дозе.	5	Изменения такие же, как при применении Рпт в эквитоксической дозе
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.

Продолжение Таблицы 53

1	2	3	4	5	6
<b>Желудок</b>					
<b>Контроль</b>	-	Гистологическое строение без особенностей (Фото 36).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Умеренная, иногда – глубокая, очаговая атрофия эпителия желез с замещением покровно-ямочным эпителием. Количество главных клеток в железах уменьшено, преобладают обкладочные (Фото 37). Избыточное слизиобразование в клетках покровно-ямочного эпителия (Фото 38). На отдельных участках слизистой оболочки – очаги деструкции покровно-ямочного эпителия, эрозии, затрагивающие покровно-ямочный эпителий, шейку и тело желез (Фото 39), кровоизлияния в слизистой оболочке (Фото 40) и под покровно-ямочным эпителием (Фото 41). Сосуды между мышечной пластинкой и мышечной оболочкой резко расширены.	5	Глубокая атрофия слизистой оболочки, сопровождающаяся ее истончением (Фото 42). В области дна и тела желез – кисты, выстланные плоским или кубическим эпителием (Фото 43).
	$\Sigma$ МПД	5	Умеренная очаговая атрофия слизистой оболочки с замещением эпителия желез покровно-ямочным эпителием (Фото 44).	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>Тощая кишка</b>					
<b>Контроль</b>	-	Гистологическое строение без особенностей (Фото 45).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Деструкция цилиндрического эпителия и стромы ворсин в области верхушки, слущивание эпителия ворсин в просвет кишки, избыток бокаловидных клеток (Фото 46). Резкое кистообразное расширение капилляров в строме ворсин. В криптах замещение эпителия желез элементами собственной пластинки слизистой оболочки (Фото 47).	5	Преобладание бокаловидных клеток в эпителии ворсин и крипт. Клеточные элементы части крипт представлены мономорфным кубическим эпителием (Фото 48).
	$\Sigma$ МПД	5	Кистообразное расширение капилляров стромы ворсин, иногда – слущивание клеток цилиндрического эпителия ворсин в просвет кишки (Фото 49).	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>Подвздошная кишка</b>					
<b>Контроль</b>	-	Гистологическое строение без особенностей (Фото 50).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Умеренная атрофия слизистой оболочки, очаговая деструкция эпителия желез и замещение его в криптах мономорфным кубическим эпителием (Фото 51).	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.

## Окончание Таблицы 53

1	2	3	4	5	6
<b>Толстая кишка</b>					
<b>Контроль</b>	-	Гистологическое строение без особенностей (Фото 52).			
<b>Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	5	Резкое увеличение числа бокаловидных клеток и усиление в них слизиобразования (Фото 53).	5	Избыток бокаловидных клеток в слизистой оболочке.
		2	Признаки деструкции слизистой оболочки в виде клеточного детрита в резко расширенном просвете отдельных желез. Эпителий этих желез представлен мономорфными кубическими клетками (Фото 54).	2	Кисты, содержащие клеточный детрит (Фото 55).
	$\Sigma$ МПД	5	Значительное увеличение количества бокаловидных клеток в слизистой оболочке (Фото 57).	1	Очаг некроза слизистой оболочки в стадии организации (Фото 56).
<b>ЧСА-Рпт</b>	$\Sigma$ ЛД <sub>50</sub>	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.
	$\Sigma$ МПД	0	Изменений не выявлено.	0	Изменений не выявлено.

В остальных органах и тканях патологических изменений не найдено.

15-дневное интраперитонеальное введение плацебо (ЧСА) в разовой дозе, эквивалентной дозе ЧСА, получаемой животными при введении водорастворимой лекарственной формы рифапентина в разовой дозе 11,53 мг/кг (суммарная ЛД<sub>50</sub>), не оказывало влияния на структуру внутренних органов крыс.

Патоморфологическое исследование показало, что 15-кратное пероральное введение рифапентина в субстанции, так же, как внутрибрюшинное применение препарата в растворимой лекарственной форме, в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>, приводит к повреждению морфологического строения тканей сердца, печени, почек, легкого, селезенки, лимфоузлов, поджелудочной железы.

При применении растворимой лекарственной формы рифапентина в дозе, суммарно составляющей МПД, повреждающее действие препарата проявляется только в печени. По морфологическим проявлениям оно идентично воздействию субстанции и выражается в виде единичных мелкоочаговых деструктивных изменений.

Таким образом, токсикологическое изучение растворимой лекарственной формы рифапентина в сравнении с его субстанцией в хроническом эксперименте на крысах выявило кардиотоксические, гепатотоксические, нефротоксические, пульмотоксические, гематотоксические и панкреатоксические свойства препарата и зависимость интенсивности их проявления от величины примененной дозы.

Признаки кардио-, гемато-, панкреа- и легочной токсичности были найдены только при патоморфологическом исследовании.

Степень выраженности **кардиотоксического действия** субстанции и лекарственной формы различна. Хотя повреждающее действие субстанции на ткань сердца проявлялось только у части животных, но, в отличие от растворимой лекарственной формы, оно сохранялось длительно и сопровождалось деструктивными изменениями кардиомиоцитов. При применении коллоидной формы умеренные мелкоочаговые изменения были выявлены только у 1 животного, получавшего препарат в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>.

Свидетельства **гепатотоксического действия** рифапентина были найдены как при клиническом, так и при патоморфологическом исследовании. Гепатотоксичность – наиболее частый побочный эффект противотуберкулезных препаратов, в том числе, рифамицинов [178]. При клинических исследованиях, проведенных на здоровых добровольцах и больных, получавших рифапентин в составе стандартной схемы лечения туберкулеза, рекомендованной ВОЗ, было показано, что препарат вызывает гепатиты, которые проявляются в виде билирубинемии, желтухи, гепатомегалии [179, 180].

В нашем исследовании было выявлено повышение содержания прямого и общего билирубина и щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных, получавших рифапентин перорально. В отличие от субстанции, применение водорастворимой лекарственной формы рифапентина на основе сывороточного альбумина не приводило к повышению уровня билирубина в сыворотке крови. Поскольку гипербилирубинемия, по мнению ряда исследователей, является результатом конкурентного взаимодействия рифамицинов и желчи за пути экскреции [179, 180], отсутствие влияния на уровень билирубина, по-видимому, связано с медленным высвобождением препарата из комплекса белок-антибиотик и, соответственно, с меньшей конкуренцией за пути выведения. Тем не менее, уровень щелочной фосфатазы, маркера холестаза [181], повышался, но только при использовании высоких доз коллоидной формы.

Признаки гепатомегалии в виде повышения массовых коэффициентов печени на 15 сутки по окончании курса введений были отмечены при применении как субстанции, так и коллоидной формы рифапентина.

Наиболее значимые показатели гепатотоксичности – уровни АЛТ и АСТ (ферменты-маркеры цитолиза гепатоцитов [182]), повышение которых в сыворотке крови больных в 3-4 раза служит сигналом для отмены терапии [183], не отличались от контроля.

Патологические изменения в печени при применении Рпт и ЧСА-Рпт были одинаковы по срокам возникновения, глубине поражения и скорости репарации. У крыс, получавших ЧСА-Рпт, они сопровождались активацией купферовских клеток.

В целом, по-видимому, можно заключить, что механизмы токсического повреждения печени при связывании рифапентина с альбумином не изменяются, и так же, как в случае использования других рифамицинов, основаны на образовании избытка прооксидантных соединений, образуемых при активации изоферментов цитохрома Р-450 [182, 184].

Как Рпт, так и ЧСА-Рпт проявляют **нефротоксические** свойства. Они выражаются в увеличении МК почек, а у части животных – и в повреждении их структуры. В отличие от субстанции, растворимая лекарственная форма препарата оказывает повреждающее действие не только на канальцевую, но и на клубочковую систему почек.

Патологические изменения в **легких** проявляются только у животных, получавших Рпт и ЧСА-Рпт в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>. Они сохраняются до конца наблюдения, завершаясь, в ряде случаев, фиброзом.

При проведении общего анализа периферической крови признаков **гематотоксичности** не выявлено ни в одной из подопытных групп. Однако были отмечены патоморфологические изменения селезенки и лимфоузлов у животных, получавших субстанцию и лекарственную форму рифапентина в высокой дозе.

Влияние субстанции и растворимой лекарственной формы на структуру **селезенки** одинаково и выражается в умеренной кратковременной атрофии лимфоидной ткани фолликулов.

В отличие от Рпт, умеренные атрофические изменения лимфоидной ткани **лимфоузлов**, возникающие под действием ЧСА-Рпт, сохраняются длительно и сопровождаются морфологическими признаками антигенного раздражения в виде обилия макрофагов в синусах и образования венул с высоким эндотелием.

Изменения, возникающие у части животных в экзокринной и эндокринной зоне **поджелудочной железы** под действием растворимой лекарственной формы рифапентина, примененной в высокой дозе, по характеру повреждающего действия, его интенсивности и длительности аналогичны изменениям, возникающим под влиянием субстанции препарата. Использование коллоидной формы в дозе, суммарно составляющей МПД, в отличие от субстанции, повреждающего действия на ткань поджелудочной железы не оказывает.

15-кратное пероральное введение субстанции рифапентина оказывает повреждающее действие на слизистую оболочку всех отделов **желудочно-кишечного канала**. Его интенсивность и продолжительность зависит от дозы препарата. Использование Рпт в дозе, суммарно составляющей ЛД<sub>50</sub>, вызывает, хотя и очаговые, но глубокие и длительные деструктивные и атрофические изменения в слизистой оболочке желудка и тощей кишки. В подвздошной кишке они выражены умеренно и завершаются полным восстановлением, в толстой кишке – проявляются не у всех животных, но в ряде случаев завершаются фиброзом. При применении субстанции в МПД структура слизистой оболочки желудка и тощей кишки – полностью восстанавливается в течение двух недель, морфологическое строение подвздошной кишки не изменяется, а в толстой кишке интенсифицируется слизееобразование.

При применении инъекционной формы рифапентина какие-либо признаки гастроинтестинальной токсичности отсутствуют.

В результате выполненной работы были сделаны следующие выводы:

- Установлены значения  $LD_{50}$  и МПД для внутривенной формы рифапентина на основе ЧСА, которые составили 340 и 273 мг/кг, соответственно.
- Диапазон токсических и переносимых доз ЧСА-Рпт весьма узок, однако МПД более, чем на порядок превышает лечебные дозы.
- При применении в переносимой дозе (суммарная МПД) ЧСА-Рпт проявляет только гепатотоксические свойства.
- При применении в дозе, суммарно составляющей  $LD_{50}$ , профиль токсического действия пероральной субстанции Рпт и внутривенной формы ЧСА-Рпт аналогичен и проявляется в гепатотоксичности, гематотоксичности, нефротоксичности, панкреатоксичности и пульмотоксичности.
- Преимущество внутривенной формы перед пероральной субстанцией заключается в отсутствии кардио- и гастроинтестинальной токсичности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На стадии фармацевтической разработки в будущий продукт закладываются те свойства, которые в конечном счете будут определять его пользу и вред для пациента. Это подразумевает не только изыскание лекарственных веществ с улучшенными характеристиками, но и совершенствование лекарственных форм.

Одним из важнейших свойств лекарственного вещества является его растворимость. Разнообразные технологии повышения истинной или коллоидной растворимости субстанций не только улучшают профиль их биораспределения, эффективности и безопасности, но и позволяют расширить показания к применению, создав дополнительные пути введения.

В данном исследовании для получения парентеральной формы противотуберкулезного антибиотика рифапентина была использована «nab-технология» с применением в качестве солюбилизатора человеческого сывороточного альбумина. Аналогичная технология была использована и при получении водосовместимых форм рифапентина, а также рифаксимины, с другими белками: сукцинилированным желатином и казеинатом натрия.

В результате была получена коллоидная форма рифапентина для парентерального введения с повышенной эффективностью и сниженной токсичностью. Было показано, что данный подход, в общем, применим и для рифаксимины, родственного антибиотика рифамицинового ряда – что, помимо основного назначения – лечения желудочно-кишечных инфекций, потенциально создает возможность его внутривенного применения для терапии туберкулеза.

Можно полагать, что разработанная технология в дальнейшем окажется применимой в отношении большого количества активных фармацевтических субстанций, для которых целесообразна разработка инъекционных форм.

## ВЫВОДЫ

- Разработаны методы получения водосовместимых форм антибиотиков, позволяющие достичь общего содержания рифапентина и рифаксими́на в суспензии около 10 и 3 мг/мл, соответственно. Показано, что для рифапентина это метод ультразвуковой гомогенизации с применением в качестве стабилизатора человеческого сывороточного альбумина или казеината натрия. Для рифаксими́на наилучшим является метод наноосаждения в присутствии казеината натрия. Размеры частиц в этих случаях не превышают 300-700 нм, что позволяет осуществлять внутривенное введение.
- Проведена оценка воспроизводимости технологических условий получения разрабатываемых лекарственных форм. Показано, что разработанные технологии хорошо воспроизводятся в лабораторном масштабе.
- Изучено взаимодействие между белками и антибиотиками. Установлено, что рифапентин образует сравнительно непрочные комплексы с человеческим сывороточным альбумином, сукцинированным желатином и казеинатом натрия (константы ассоциации  $\sim 10^3$ - $10^4$  л/моль), а рифаксими́н – с казеинатом натрия (константа ассоциации  $\sim 10^5$  л/моль).
- Изучена эффективность внутривенной формы рифапентина на модели экспериментального туберкулеза мышей. Показано, что в дозах 5 и 10 мг/кг внутривенная форма равноэффективна перорально вводимой субстанции, а в дозе 20 мг/кг ее эффективность достоверно превышает эффективность субстанции.
- Изучена острая и хроническая токсичность внутривенной формы рифапентина. Показано, что величина максимальной переносимой дозы более чем на порядок превышает лечебные дозы. Профили токсического действия перорально вводимой субстанции и внутривенной формы близки. Преимущество внутривенной формы рифапентина заключается в ослаблении гепатотоксических свойств антибиотика и отсутствии кардио- и гастроинтестинальной токсичности.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЛТ	–	аланинаминотрансфераза
АСТ	–	аспартатаминотрансфераза
АЦН	–	ацетонитрил
БЦЖ	–	бациллы Кальметта-Жерена
в/б	–	внутрибрюшинное введение
в/в	–	внутривенное введение
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ДХМ	–	дихлорметан
КН	–	натриевая соль казеина (казеинат натрия)
КН-Рпт	–	водосовместимая форма рифапентина на основе КН
КН-Рфс	–	водосовместимая форма рифаксимины на основе КН
МБТ	–	туберкулезные микобактерии
м/о%	–	массо-объемный процент (1 г в 100 мл, или 10 мг/мл)
МПД	–	максимальная переносимая доза
МПК	–	минимальная подавляющая концентрация
ПАВ	–	поверхностно-активное вещество
ПАСК	–	пара-аминосалициловая кислота
п.к.	–	время после курса введений препарата
п/о	–	пероральное введение
ПТП	–	противотуберкулезные препараты
ПЭГ	–	полиэтиленгликоль
Рбт	–	рифабутин
Рпт	–	рифапентин
Рфм	–	рифампицин
Рфс	–	рифаксимин
СЖ	–	сукцинированный желатин
СЖ-Рпт	–	водосовместимая форма рифапентина на основе СЖ
ТБ	–	туберкулез
ТЛН	–	твердые липидные наночастицы
ЧСА	–	человеческий сывороточный альбумин

ЧСА-Рпт	– водосовместимая форма рифапентина на основе ЧСА
ЩФ	– щелочная фосфатаза
AcOEt	– этилацетат
$c_{\text{вод.}}$	– содержание антибиотика в водной фазе
$c_{\text{общ.}}$	– общее содержание антибиотика
DOTS	– лечение под непосредственным контролем коротким курсом (directly observed treatment short course)
$d_z$	– средний диаметр частиц
EtOH	– этанол
FDA	– Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration)
$I_p$	– индекс полидисперсности
$\text{Me}_2\text{CO}$	– ацетон
N	– мощность (ультразвука)
O	– органическая фаза
$P_r$	– давление гомогенизации
PBS	– фосфатный солевой буфер
PF68	– поллоксамер Pluronic <sup>®</sup> F-68
PLA	– полилактид
PLGA	– сополимер молочной и гликолевой кислот (poly(lactic-co-glycolic acid))
$R^2$	– коэффициент детерминации
S	– стандартное отклонение
TPGS	– D- $\alpha$ -токоферилполиэтиленгликольсукцинат
W	– водная фаза
$\bar{X}$	– среднее значение
$\lambda$	– длина волны
$\eta$	– выход по антибиотику от теоретического значения
$\tau$	– время
$\omega$	– скорость вращения или перемешивания

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- 1 Водосовместимые полимерные композиции для доставки биологически активных веществ: пат. 2580649 Рос. Федерация. № 2015111098/15; заявл. 27.03.2015; опубл. 10.04.2016, Бюл. № 10. 36 с.
- 2 Jiang X., Wang W., Xu H. et al. Water-compatible dendritic macrophotoinitiator containing thioxanthone // *J Photochem Photobiol A Chem.* 2006. V. 181. P. 233-237.
- 3 Перельман М.И., Корякин В.А., Богадельникова И.В. Фтизиатрия. М.: Медицина, 2004. 521 с. ISBN 5-225-04082-9.
- 4 Туберкулез: база знаний по биологии человека [Электронный ресурс]. URL: [http://humbio.ru/humbio/infect\\_har/003ed874.htm](http://humbio.ru/humbio/infect_har/003ed874.htm) (дата обращения: 02.03.2018).
- 5 Zysk K.G. *Medicine in the Veda: Religious Healing in the Veda.* Motilal Banarsidass Publ, 2009. 349 p. ISBN 8120814002.
- 6 Ts'un-Yan L. The Taoists' knowledge of tuberculosis in the twelfth century // *Toung Pao.* 1971. V. 57. P. 285-301.
- 7 Madkour M.M., Warrell D.A. *Tuberculosis.* Birkhäuser, 2004. 928 p. ISBN 3540014411.
- 8 Петренко В.И. Фтизиатрия. Киев: Медицина, 2008. 488 с. ISBN 978-966-8144-99-8.
- 9 Shryock R.H. *National Tuberculosis Association, 1904-1954: a study of the voluntary health movement in the United States.* Ayer Publishing, 1954. 342 p. ISBN 0405098316.
- 10 Loomis H.P. Some personal observations on the effect of intra-pleural injection of nitrogen gas in tuberculosis // *Trans Am Climatol Assoc.* 1900. V. 16. P. 61-63.
- 11 Yeo I.B. The bacteric origin of tuberculosis, and its antiseptic treatment // *Br J Med.* 1879. V. 2. No. 990. P. 982-983.
- 12 Lamplough C. One hundred cases of pulmonary tuberculosis treated with large doses of beechwood creosote // *Br Med J.* 1898. V. 1. No. 1952. P. 1383-1386.
- 13 Maguire R. Prognosis and treatment of pulmonary tuberculosis // *Br Med J.* 1900. V. 2. No. 2085. P. 1695-1697.
- 14 Comroe J.H. Pay dirt: the story of streptomycin. Part I: from Waksman to Waksman // *Am Rev Respir Dis.* 1978. V. 117. No. 4. P. 773-781.
- 15 Lehmann J. Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis // *Lancet.* 1946. V. 247. No. 6384. P. 15.
- 16 Sensi P., Margalith P., Timbal M.T. Rifomycin, a new antibiotic: preliminary report // *Farmaco Sci.* 1959. V. 14. No. 2. P. 146-147.
- 17 Piperazinylimino rifamycins: пат. 4002752 США. № 661687; заявл. 26.02.1976; опубл. 11.01.1977; приоритет 25.03.1975, № 10020/75 (Великобритания).
- 18 Heifets L. *The Second Coming of the White Plague.* Tate Publishing, 2012. 230 p. ISBN 1621478750.

- 19 Global Tuberculosis Report 2018. World Health Organization, 2018. 265 p. ISBN 978-92-4-156564-6.
- 20 Bhargava A., Pinto L., Pai M. Mismanagement of tuberculosis in India: Causes, consequences, and the way forward // *Hypothesis*. 2011. V. 9. No. 1. P. 1-13.
- 21 Туберкулез в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. М., 2013. 280 с.
- 22 Mjid M., Cherif J., Ben Salah N. et al. Tuberculosis epidemiology // *Rev Pneumol Clin*. 2015. V. 71. No. 2-3. P. 67-72.
- 23 Kazemnejad A., Arsang Jang S., Amani F. et al. Global epidemic trend of tuberculosis during 1990-2010: using segmented regression model // *J Res Health Sci*. 2014. V. 14 No. 2. P. 115-121.
- 24 El Kamel A., Joobeur S., Shkiri N. Fight against tuberculosis in the world // *Rev Pneumol Clin*. 2015. V. 71. No. 2-3. P. 181-187.
- 25 MacPherson P., Houben R.M., Glynn J.R. et al. Pre-treatment loss to follow-up in tuberculosis patients in low- and lower-middle-income countries and high-burden countries: a systematic review and meta-analysis // *Bull World Health Organ*. 2014. V. 92. No. 2. P. 126-138.
- 26 Hokey D.A., Ginsberg A. The current state of tuberculosis vaccines // *Hum Vaccin Immunother*. 2013. V. 9. No. 10. P. 2142-2146.
- 27 Abubakar I., Pimpin L., Ariti C. et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guerin vaccination against tuberculosis // *Health technol assess*. 2013. V. 17. No. 37. P. 1-372.
- 28 Aagard C., Hoang T., Dietrich J. et al. A multidosage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure // *Nat Med*. 2011. V. 17. No. 2. P. 189-194.
- 29 Перельман М.И. Фтизиатрия. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 512 с. ISBN 978-5-9704-0497-3.
- 30 Bos K.I., Harkins K.M., Herbig A. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis // *Nature*. 2014. V. 514. No. 7523. P. 494-497.
- 31 Boritsch E.C., Supply P., Honoré N. et al. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent // *Mol Microbiol*. 2014. V. 93. No. 5. P. 835-852.
- 32 Scott C.C., Botelho R.J., Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system // *J Membr Biol*. 2003. V. 193. No. 3. P. 137-152.
- 33 Weerdenburg E.M., Peters P.J., van der Wel N.N. et al. How do mycobacteria activate CD8+ T cells? // *Trends Microbiol*. 2010. V. 18. No. 1. P. 1-10.
- 34 Singh A.K., Abjimanyu, Yadav A.B. et al. HLA-DRB1\*1501 and VDR polymorphisms and survival of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages

- exposed to inhalable microparticles // *Pharmacogenomics*. 2013. V. 14. No. 5. P. 531-540.
- 35 Bryant J.M., Harris S.R., Parkhill J. et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study // *Lancet Respir Med*. 2013. V. 1. No. 10. P. 786-792.
- 36 Saiga H., Shimada Y., Takeda K. Innate immune effectors in mycobacterial infection // *Clin Dev Immunol*. 2011. P. 1-8.
- 37 Deretic V. Autophagy in tuberculosis // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014. V. 4. No. 11. P. 1-15.
- 38 Matsumoto S. Molecular mechanisms of dormancy and drug tolerance in mycobacteria // *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2013. V. 82. No. 3. P. 119-122.
- 39 Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной терапии. Издательство НИИАХ СГМА, 2007. 586 с.
- 40 Dobbs T.E., Webb R.M. Chemotherapy of tuberculosis // *Microbiol Spectr*. 2017. V. 5. No. 2. P. 1-16.
- 41 Стручков В.И. Справочник по клинической хирургии. М.: Медицина, 1967. 520 с.
- 42 Dartois V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells // *Nat Rev Microbiol*. 2014. V. 12. No. 3. P. 159-167.
- 43 Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики (пер. с англ.). М: Мир, 1985. 272 с.
- 44 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
- 45 Riva S., Silvestri L.G. Rifamycins: a general review // *Annu Rev Microbiol*. 1972. V. 26. P. 199-224.
- 46 Wehrli W., Staehelin M. Actions of the Rifamycins // *Bacteriol Rev*. 1971. V. 35. No. 3. P. 290-309.
- 47 Aristoff P.A., Garcia G.A., Kirchoff P.D. et al. Rifamycins – obstacles and opportunities // *Tuberculosis*. 2010. V. 90. No. 2. P. 94-118.
- 48 Arioli V., Berti M., Carniti G. et al. Antibacterial activity of DL473, a new semisynthetic rifamycin derivative // *J Antibiot*. 1981. V. 34. No. 8. P. 1026-1032.
- 49 Rastogi N., Goh K.S., Berchel M. et al. Activity of Rifapentine and its metabolite 25-O-desacetyl-rifapentine compared with rifampicin and rifabutin against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* and *M. bovis BCG* // *J Antimicrob Chemother*. 2000. V. 46. No. 4. P. 565-570.
- 50 Saha R.N., Kole P.L. Rifapentine – a new edge to tuberculosis therapy // *Pharm Rev*. 2005. V. 1. No. 3. (URL: [http://www.pharmainfo.net/latest-reviews\(2005\)](http://www.pharmainfo.net/latest-reviews(2005))).
- 51 Alfarisi O., Alghamdi W.A., Al-Shaer M.H. et al. Rifampin vs Rifapentine: what is the preferred rifamycin for tuberculosis? // *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017. V. 10. No. 10. P. 1027-1036.
- 52 Туберкулез: выявление, лечение и мониторинг по К. Томену (пер. с англ.). Женева: Всемирная Организация Здравоохранения, 2004. 406 с.

- 53 Omotosho B.A., Adebayo A.M., Adeniyi B.O. et al. Tuberculosis treatment outcomes and interruption among patients assessing DOTS regimen in a tertiary hospital in semi-urban area of southwestern Nigeria // *Niger J Med*. 2014. V. 23. No. 1. P. 51-56.
- 54 Lienhardt C. Fundamental research is the key to eliminating TB // *Nature*. 2014. V. 507. No. 7493. P. 401.
- 55 Lambert N., Abdalla A.E., Duan X. et al. Emerging drugs and drug targets against tuberculosis // *J Drug Target*. 2017. V. 25. No. 4. P. 296-306.
- 56 Паценко М.Б., Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. Перспективы применения нанотехнологий в лечении бактериальных инфекций // *Вестник новых медицинских технологий*. 2018. Т. 1. С. 131-140.
- 57 Описание схемы лечения «ВРАМЗ» [Электронный ресурс] // TB Alliance. URL: <https://www.tballiance.org/portfolio/regimen/bramz> (дата обращения: 25.03.2018).
- 58 Enhancing the bioavailability of poorly soluble drugs: Abstracts of the Pharmaceutical Technology Europe / P.G. Nielsen. 2010. V. 22. No. 3. P. 1-4.
- 59 Kreuter J. Nanoparticles. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Marcel Dekker, 1994. V. 10. P. 165-190.
- 60 Zhang L., Pornpattananangku D., Ju C.M. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery // *Curr Med Chem*. 2010. V. 17. No. 6. P. 585-594.
- 61 Xue X., Chen X., Mao X. et al. Amino-terminated generation 2 poly(amidoamine) dendrimer as a potential broad-spectrum, nonresistance-inducing antibacterial agent // *AAPS J*. 2013. V. 15. No. 1. P. 132-142.
- 62 Flanagan R.S., Cosío G., Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies // *Nat Rev Microbiol*. 2009. V. 7. No. 5. P. 355-366.
- 63 Hirota K., Tomoda K., Inaqawa H. et al. Stimulation of phagocytic activity of alveolar macrophages toward artificial microspheres by infection with mycobacteria // *Pharm Res*. 2008. V. 25. No. 6. P. 1420-1430.
- 64 Banyal S., Malik P., Tuli H.S. et al. Advances in nanotechnology for diagnosis and treatment of tuberculosis // *Curr Opin Pulm Med*. 2013. V. 19. No. 3. P. 289-297.
- 65 Санжаков М.А., Ипатова О.М., Торховская Т.И. и др. Наночастицы как системы транспорта для противотуберкулезных лекарств // *Актуальные вопросы фтизиатрии*. 2013. Т. 8. С. 37-44.
- 66 Processes for Production of Nanoparticles and Microparticles by Spray Freezing into Liquid: пат. 2003/041602 A1; 6862890 B2 США. № 10/062,648; заявл. 30.01.2001; опубл. 06.03.2003.
- 67 Изучение биопленок микобактерий туберкулеза как фактора развития лекарственной устойчивости: тезисы конференции «Молодежь в науке: новые аргументы» / М.В. Бадлеева, М.И. Андрианова [Электронный ресурс]. Доступно по ссылке: <https://elibrary.ru/item.asp?id=24819451>.
- 68 Bakkiyaraj D., Pandian S.K. Biofilm inhibition by nanoparticles // *Antibiofilm Agents*. 2014. V. 8. P. 385-406.

- 69 Masserini M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery // *ISRN Biochemistry*. 2013. 18 p.
- 70 Ebrahimi Sharmabadi H., Mohavedi F., Esfahani M.K.M. et al. Efficacy of cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma // *Tumour Biol*. 2014. V. 35. No. 5. P. 4799-4806.
- 71 Müller R.H., Keck C.M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles // *J Biotechnol*. 2004. V. 113. No. 1-3. P. 151-170.
- 72 Solid Lipid Nanoparticles Entrapping Hydrophilic/Amphiphilic Drug and a Process For Preparing the Same: пат. 2013105101 A1 международный. № 2012/000154; заявл. 05.03.2012.; опубл. 18.07.2013; приоритет 13.01.2012, № 2012/00127 (Индия).
- 73 Schwendener R.A. Liposomes in biology and medicine // *Adv Exp Med Biol*. 2007. V. 620. P. 117-128.
- 74 Johansson J., Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components // *Eur J Biochem*. 1997. V. 244. No. 3. P. 675-693.
- 75 Мельянцева Л.П., Крейнес В.М., Шраер Т.И. Влияние продуктов перекисного окисления липидов липосом на антибактериальную активность липосом // *Антибиотики и химиотерапия*. 1992. Т. 37. С. 8-10.
- 76 Атруз О.М., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М. Влияние липосом различного липидного состава на развитие кислородного взрыва в моноцитах крови и альвеолярных макрофагах человека // *Биол. Мембраны*. 2000. Т. 17. № 5. С. 510-518.
- 77 Kalluru R., Fenaroli F., Westmoreland D. et al. Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes // *J Cell Sci*. 2013. V. 126. No. 14. P. 3043-3054.
- 78 Фармацевтическая композиция для лечения туберкулеза и заболеваний, опосредованных *Helicobacter pylori*, на основе полимерных наночастиц, способ ее получения и способы лечения: пат. 012121 евразийский. № 2008000078; заявл. 20.06.2008; опубл. 28.08.2009. 14 с.
- 79 Лекарственное средство пролонгированного действия с дозированным высвобождением в органы-мишени на основе D-циклосерина для лечения резистентных форм туберкулеза: пат. 2403041 С2 Рос. Федерация. № 2008149980/15; заявл. 18.12.2008; опубл. 10.11.2010.
- 80 Process for the preparation of poly-DL-lactide-co-glycolide nanoparticles having antitubercular drugs encapsulated therein: пат. 1868589 A1 европейский. № 20050735492; заявл. 11.04.2005; опубл. 26.12.2007.
- 81 Kisich K.O., Gelperina S.E., Hippins M.P. et al. Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis* // *Int J Pharm*. 2007. V. 345, No. 1-2. P. 154-162.

- 82 Anisimova Y.V., Gelperina S.E., Peloquin C.A. et al. Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *M. tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages // *J Nanoparticle Res.* 2000. V. 2. No. 2. P. 165-171.
- 83 Ванчугова Л.В., Максименко О.О., Шипуло Е.В. и др. Разработка наносомальной формы стрептомицина и изучение ее активности на модели септической инфекции мышей // *Антибиот. химиотер.* 2005. Т. 50. № 1. С. 13-19.
- 84 Оганесян Е.А., Будько А.П., Максименко О.О. и др. Разработка и изучение наносомальной лекарственной формы рифампицина // *Антибиот. химиотер.* 2005. Т. 50. № 8-9. С. 15-19.
- 85 Ribostamycin sulfate composition freeze-dried powder for injection: пат. 103536554 А Китай. № 201310481684; заявл. 15.10.2013; опубл. 29.01.2014.
- 86 Nasiruddin M., Neyaz M.K., Das S. Nanotechnology-based approach in tuberculosis treatment // *Tuberc Res Treat.* 2017. P. 1-12.
- 87 Курунов Ю.Н., Урсов И.Г., Краснов В.А. Эффективность липосомальной лекарственной формы антибактериальных препаратов в ингаляционной терапии экспериментального туберкулеза // *Проблемы туберкулеза.* 1995. № 1. С. 38-40.
- 88 Гуревич Г.Л., Березовская Л.Н., Мануйлов К.К. Особенности фармакокинетики рифампицина, включенного в липосомы, у крыс при внутритрахеальном введении // *Антибиотики и химиотерапия.* 1992. Т. 37. № 7. С. 25-27.
- 89 Katteboinaa S., Chandrasekhar V.S.R., Balaji S. Drug nanocrystals: a novel formulation approach for poorly soluble drugs // *Int J Pharm Res.* 2009. V. 1. No. 3. P. 682-694.
- 90 Peters K., Leitzke S., Diederichs J.E. et al. Preparation of a clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection // *J Antimicrob Chemother.* 2000. V. 45. No. 1. P. 77-83.
- 91 Теслев, А.А. К вопросу применения твердых дисперсных систем для улучшения биофармацевтических характеристик лекарственных средств // *Фармацевтические технологии.* 2014. № 2. С. 18-21.
- 92 Nighute A.B., Bhise S.B. Enhancement of dissolution rate of Rifabutin by preparation of microcrystals using solvent change method // *Int J Pharm Res.* 2009. V. 1. No. 2. P. 142-148.
- 93 Madhav P.V., Swati R., Sharma Y.P. et al. An approach to enhance the solubility of Rifapentine by solid dispersion technique using hydrophilic carriers // *J Drug Deliv Ther.* 2013. V. 3. No. 4. P. 8-14.
- 94 Kalra K., Sharma S., Jain D.A. Enhancement of solubility and dissolution rate of Rifapentine by melt granulation technique // *Int J Pharm.* 2012. V. 3. No. 3. P. 1503-1506.
- 95 Kalra K., Gaur M., Nainwal P. et al. Solubility enhancement of Rifapentine by inclusion complex // *Int J Drug Deliv.* 2011. V. 3. P. 432-438.

- 96 Kalra K., Sharma S., Jain D.A. Comparative study of solubility enhancement of Rifapentine by solid dispersion and inclusion complex // *Int J Pharm.* 2012. V. 3. No. 4. P. 1607-1613.
- 97 Strickley, R.G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations // *Pharm Res.* 2004. V. 21. No. 2. P. 201-230.
- 98 Gelderblom H., Verweij J., Nooter K. et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation // *Eur J Cancer.* 2001. V. 37. No. 13. P. 1590-1598.
- 99 Vitamin E TPGS, NF and food grade. Брошюра производителя Isochem. 6 p.
- 100 Zhang Z., Songwei T., Si-Shen F. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery // *Biomaterials.* 2012. V. 33. No. 19. P. 4889-4906.
- 101 Pharmaceutical formulations comprising paclitaxel, derivatives and pharmaceutically acceptable salts thereof: пат. 20050191323 США. № US 11/100,681; заявл. 07.04.2005; опубл. 01.09.2005.
- 102 Bouyer E., Mekhloufi G., Rosilio V. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? // *Int J Pharm.* 2012. V. 436. No. 1-2. P. 359-378.
- 103 Wang Y.J., Hanson M.A. Parenteral formulations of proteins and peptides: stability and stabilizers // *J Parent Sci Tech.* 1988. V. 42. No. 2S. P. S3-S26.
- 104 Fu Q., Sun J., Zhang W. et al. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery // *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2009. V. 4. No. 3. P. 262-272.
- 105 Paál K., Müller J., Hegedûs L. High affinity binding of Paclitaxel to human serum albumin // *Eur J Biochem.* 2001. V. 268. No. 7. P. 2187-2191.
- 106 Hawkins M.J., Soon-Shiong P., Desai N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine // *Adv Drug Deliv Rev.* 2008. V. 60. No. 8. P. 876-885.
- 107 Yardley D.A. Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery // *J Control Release.* 2013. V. 170. No. 3. P. 365-372.
- 108 Elsadek B., Kratz F. Impact of albumin on drug delivery – new applications on the horizon // *J Control Release.* 2012. V. 157. No. 1. P. 4-28.
- 109 Способ получения водорастворимой фармацевтической композиции антибиотика из группы рифамицинов и фармацевтическая композиция для лечения туберкулеза и заболеваний, связанных с *Helicobacter pylori*: пат. 021117 евразийский. № 201001854; заявл. 27.12.2010; опубл. 30.04.2015. 11 с.
- 110 Способ получения водорастворимой лекарственной формы антибиотика из группы рифамицинов и композиция, полученная указанным способом: пат. 2012/089220 международный. № PCT/EA2011/000014; заявл. 21.12.2011; опубл. 05.07.2012.
- 111 Шибаев В.П. Спецпрактикум по физико-химическим и физико-механическим методам исследования полимеров. МГУ им. М.В. Ломоносова, 2013. 112 с.

- 112 NTA principles and methodology. Malvern Instruments Worldwide, 2015. 16 p.
- 113 Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: Люмэкс, 2008. 208 с. ISBN 5-903297-01-3.
- 114 Компьютерное моделирование химико-технологических процессов (лекции) / под ред. Т.Н. Гартмана. РХТУ им. Д.И. Менделеева, кафедра информатики и компьютерного проектирования. 2012. Электронный материал.
- 115 Гланц С. Медико-биологическая статистика (пер с англ.). М.: Практика, 1999. 459 с. ISBN 5-89816-009-4.
- 116 Адлер Ю.П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 278 с.
- 117 Эмануэль Н.М., Кузьмин М.Г. Кинетика люминесценции. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1985. 224 с.
- 118 Eftink M.R., Ghiron C.A. Fluorescence quenching studies with proteins // *Anal Biochem.* 1981. V. 114. No. 2. P. 199-227.
- 119 European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях): от 18.03.1986; принята Советом Европы // *European Treaty Series*, No. 123. Страсбург, 1986.
- 120 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.]. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- 121 ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. Введ. 02.12.2009. М.: Стандартинформ, 2010. 28 с.
- 122 Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Государственное издательство медицинской литературы, 1963. 162 с.
- 123 Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man // *Cancer Chemother Rep.* 1966. V. 50. No. 4. P. 219-244.
- 124 Rifapentine safety data sheet [Электронный ресурс] // Sigma-Aldrich. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0533?lang=en&region=RU> (дата обращения: 30.03.2018.)
- 125 Priftin. Pharmacologist's Review. NDA-752 [Электронный ресурс] // Center for Drug Evaluation and Research. URL: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/021024a-2.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/021024a-2.pdf). (дата обращения: 30.03.2018.)
- 126 Lindenberg M., Kopp S., Dressman J.B. Classification of orally administered drugs of the World Health Organization Model List of Essential Medicines according to the biopharmaceutical classification system // *Eur J Pharm Biopharm.* 2004. V. 58. No. 2. P. 265-278.

- 127 The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance // U.S. Food and Drug Administration. Дата обновления: 04.01.2009. URL: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm> (дата обращения: 30.03.2018).
- 128 Priftin<sup>®</sup> tablets 150 mg. Proposed text of the labelling annotated // Food and Drug Administration, 22.06.1998. 18 p.
- 129 Koo H.L., DuPont H.L., Huang D.B. The role of Rifaximin in the treatment and chemoprophylaxis of travelers' diarrhea // *Ther Clin Risk Manag.* 2009. P. 841-848.
- 130 Jouyban A., Fakhree M.A.A. Experimental and computational methods pertaining to drug solubility. InTech, 2012. 528 p. ISBN 978-953-51-0004-1.
- 131 Rifapentine (DB01201) // Drug Bank. Дата создания: 13.06.2005. Дата обновления: 03.02.2018. URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01201> (дата обращения: 10.04.2018).
- 132 Rifaximin (DB01220) // Drug Bank. Дата создания: 13.06.2005. Дата обновления: 09.04.2018. URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01220> (дата обращения: 10.04.2018).
- 133 Copolovici L., Niimets Ü. Salting-in and salting-out effects of ionic and neutral osmotica on limonene and linalool Henry's law constants and octanol/water partition coefficients // *Chemosphere.* 2007. V. 69. No. 4. P. 621-629.
- 134 Matkovich C.E., Christian G.D. Salting-out of acetone from water – basis of a new solvent extraction system // *Analytical Chemistry.* 1973. V. 45. No. 11. P. 1915-1921.
- 135 Buckton G., Breezer A.E. The relationship between particle size and solubility // *Int J Pharm.* 1992. V. 82. No. 3. P. R7-R10.
- 136 Rifapentine hydrohalides: пат. 9000553 A1 международный. № 89/00694; заявл. 21.06.1989; опубл. 25.01.1990; приоритет 13.07.1988, № 8816620.2 (Великобритания).
- 137 Pure crystalline form of Rifapentine: пат. 9200302 A1 международный. № 91/01036; заявл. 05.06.1991; опубл. 09.01.1992; приоритет 29.06.1990, № 90112458.6 (Великобритания).
- 138 Kumar, J. Newton A.M.J. Rifaximin-chitosan nanoparticles for inflammatory bowel disease (IBD) // *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2017. V. 11. No. 1. P. 41-52.
- 139 Kumar J., Newton A.M.J. Colon Targeted Rifaximin Nanosuspension for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD) // *Antiinflamm Allergy Agents Med Chem.* 2016. V. 15. No. 2. P. 101-117.
- 140 Kragh-Hansen U., Chuang V.T.G., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin // *Biol Pharm Bull.* 2002. V. 25. No. 6. P. 695-704.
- 141 Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles // *J Control Release.* 2008. V. 132. No. 3. P. 171-183.

- 142 Yang J.-D., Deng S.X., Liu Z.F. et al. Fluorescence quenching of serum albumin by rifamycin antibiotics and their analytical application // *Luminescence*. 2007. V. 22. No. 6. P. 556-566.
- 143 Wang C.-X., Yan F.-F., Zhang Y.-X. et al. Spectroscopic investigation of the interaction between rifabutin and bovine serum albumin // *J Photochem Photobiol A Chem*. 2007. V. 192. P. 23-28.
- 144 Kosher gelatin: functional & nutritional properties [Электронный ресурс] // Geliko. URL: <http://www.geliko.com>.
- 145 Gelofusine, modified fluid gelatin. Брошюра В. Braun Melsungen AG. 4 с.
- 146 Elzoghby A.O., El-Fotoh W.S.A., Elgindy N.A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems // *J Control Release*. 2011. V. 153. No. 3. P. 206-216.
- 147 Beta-casein micelles as nano-delivery vehicles for chemotherapeutic drugs / 16<sup>th</sup> International Conference on Bioencapsulation; Y.D. Livney, A. Shapira, Y.G. Assaraf. 2008. P14. P. 1-4.
- 148 Kakran M., Shegokar R., Sahoo N.G. et al. Fabrication of quercetin nanocrystals: comparison of different methods // *Eur J Pharm Biopharm*. 2012. V. 80. P. 113-121.
- 149 Препарат Абрахане® [Электронный ресурс] // Регистр лекарственных средств URL: [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_47054.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_47054.htm) (дата обращения: 10.04.2018).
- 150 Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIII издание. М.: ФЭМБ, 2015. Т. I. 1470 с.
- 151 Emary W.B., Toren P.C., Mathews B. et al. Disposition and metabolism of Rifapentine, a rifamycin antibiotic, in mice, rats, and monkeys // *Drug Metab Dispos*. 1998. V. 26. No. 8. P. 725-731.
- 152 Евдокимова О.В., Марков В.В., Курнакова О.Л. Методика проектирования рецептур инновационных продуктов с использованием обобщенной функции желательности Харрингтона // *Ползуновский Вестник*. 2015. № 2. С. 74-78.
- 153 Jagganath C., Allaudeen H.S., Hunter R.L. Activities of poloxamer CRL8131 against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo // *Antimicrob Agents Chemother*. 1995. V. 39. No. 6. P. 1349-1354.
- 154 Moghimi S.M., Murray J.C. Poloxamer-188 revisited: a potentially valuable immune modulator // *J Natl Cancer Inst*. 1996. V. 88. No. 11. P. 766-768.
- 155 5 common misconceptions in freeze drying [Электронный ресурс] // Biopharma Process Systems. URL: [www.biopharmaprocesssystems.com](http://www.biopharmaprocesssystems.com) (дата обращения: 10.04.2018).
- 156 Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals // *Int J Pharm*. 2000. V. 203. No. 1-2. P. 1-60.
- 157 Kett V.L., Fitzpatrick S., Cooper B. et al. An investigation into the subambient behavior of aqueous mannitol solutions using differential scanning calorimetry, cold stage microscopy, and X-ray diffractometry // *J Pharm Sci*. 2003. V. 92. No. 9. P. 1919-1929.

- 158 Yoshinari T., Forbes R.T., York P. et al. Moisture induced polymorphic transition of mannitol and its morphological transformation // *Int J Pharm.* 2002. V. 247. No. 1-2. P. 69-77.
- 159 Kim A.I., Akers M.J., Nail S.L. The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute // *J Pharm Sci.* 1998. V. 87. No. 8. P. 931-935.
- 160 Yu L., Milton N., Groleau E.G. et al. Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications // *J Pharm Sci.* 1999. V. 88. No. 2. P. 196-198.
- 161 Fitzpatrick S., Saklatvala R. Understanding the physical stability of freeze dried dosage forms from the glass transition temperature of the amorphous components // *J Pharm Sci.* 2003. V. 92. No. 12. P. 2495-2501.
- 162 Johnson R.E., Kirchhoff C.F., Gaud H.T. Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization // *J Pharm Sci.* 2002. V. 91. No. 4. P. 914-922.
- 163 Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T<sub>g</sub> in pharmaceutical lyophilization // *J Pharm Sci.* 2001. V. 90. No. 7. P. 872-887.
- 164 Nanoparticle albumin bound (nab) technology: a nanotechnology platform for biologically interactive drug delivery and targeting (материалы презентации) / N.P. Desai: компания Abraxis BioScience Inc.
- 165 Nikonenko B.V., Hanrahan C. Murine model of tuberculosis. In vitro and in vivo study // *Russ J Immunol.* 2002. V. 7. No. 4. P. 307-322.
- 166 Nikonenko B.V., Samala R., Einick L. et al. Rapid, simple in vivo screen for new drugs active against Mycobacterium tuberculosis // *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. V. 48. No. 12. P. 4550-4555.
- 167 Cardona P.J., Cooper A., Luquin M. et al. The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity // *Scand J Immunol.* 1999. V. 49. No. 4. P. 362-366.
- 168 Young D. Animal models of tuberculosis // *Eur J Immunol.* 2009. V. 39. No. 8. P. 2011-2014.
- 169 Rosenthal I.M., Zhang M., Williams K.N. et al. Daily dosing of Rifapentine cures tuberculosis in three months or less in the murine model // *PLoS Med.* 2007. V. 4. No. 12. P. 1931-1939.
- 170 Heifetz L., Sanchez T., Vanderkolk J. Animal models of tuberculosis // *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. V. 43. No. 1. P. 25-28.
- 171 Rosenthal I.M., Williams K., Tyagi S. et al. Potent twice-weekly rifapentine-containing regimens in murine tuberculosis // *Am J Respir Crit Care Med.* 2006. V. 174. No. 1. P. 94-101.
- 172 Lenaerts A.M.J.A., Chase S.E., Chmielewski A.J. et al. Evaluation of rifapentine in long-term treatment regimens for tuberculosis in mice // *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. V. 43. No. 10. P. 2356-2360.

- 173 Lipophilic oligosaccharide antibiotic compositions: пат. № 5,776,912 США. № 770,470; заявл. 20.12.1996; опубл. 07.07.1998.
- 174 Serum albumin-based parenteral formulations of polyene macrolides: пат. 2000047187 международный. № 2000/000146; заявл. 10.02.2000; опубл. 17.08.2000.
- 175 Schnitzer J.E., Oh P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin // *J Biol Chem*. 1994. V. 269. No. 8. P. 6072-6082.
- 176 Zhou K., Li J., Luo J. et al. Crystal modification of Rifapentine using different solvents // *Frontiers Chem Eng China*. 2010. V. 4. No. 1. P. 65-69.
- 177 Zhou K., Li J., Zheng D.S. Growth, characterization and crystal structure analysis of Rifapentine // *J Molecular Structure*. 2010. V. 983. P. 27-31.
- 178 Yew W.W., Leung C.C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity // *Respirology*. 2006. V. 11. No. 6. P. 699-707.
- 179 Dorman S.E., Goldberg S., Stout J.E. et al. Substitution of Rifapentine for Rifampin during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis: study 29 of the tuberculosis trials consortium // *J Infect Dis*. 2012. V. 206. No. 7. P. 1030-1040.
- 180 Dooley K.E., Bliven-Sizemore E.E., Weiner M. et al. Safety and pharmacokinetics of escalating daily doses of the antituberculosis drug Rifapentine in healthy volunteers // *Clin Pharmacol Ther*. 2012. V. 91. No. 5. P. 881-888.
- 181 Ельчанинова С.А., Ройтман А.П. Ферменты. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. М.: ГЭОТАР Медиа, 2012. С. 177-192.
- 182 Суханов Д.С. Фармакотерапия лекарственных поражений печени при туберкулезе (экспериментально-клиническое исследование): дис. д-ра мед. наук. Спб., 2014. 273 с.
- 183 Shin H.-J., Kwon Y.-S. Treatment of drug susceptible pulmonary tuberculosis // *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2015. V. 78. No. 3. P. 161-167.
- 184 Williamson B., Dooley K.E., Zhang Y. et al. Induction of influx and efflux transporters and cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes by Rifampin, Rifabutin, and Rifapentine // *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. V. 57. No. 12. P. 6366-6369.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

### Таблицы

- Таблица 1. Краткая справка об основных противотуберкулезных препаратах – **С. 18**
- Таблица 2. Изучение влияния вспомогательных веществ и обработки субстанции на растворимость рифапентина в воде (пояснение в тексте) – **С. 38**
- Таблица 3. Приготовление исходных растворов белков и антибиотиков для изучения их связывания – **С. 51**
- Таблица 4. Приготовление растворов с различным соотношением белка (Б) и антибиотика (А) для флуориметрического исследования – **С. 52**
- Таблица 5. Характеристика экспериментальных групп – **С. 57**
- Таблица 6. Дизайн исследования – **С. 58**
- Таблица 7. Калибровочные зависимости оптической плотности от концентрации растворов рифапентина и рифаксимины – **С. 62**
- Таблица 8. Влияние вспомогательных веществ и обработки субстанции на растворимость рифапентина в воде – **С. 65**
- Таблица 9. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом nanoосаждения – **С. 73**
- Таблица 10. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом nanoосаждения – **С. 73**
- Таблица 11. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом диспергирования – **С. 74**
- Таблица 12. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом диспергирования – **С. 75**
- Таблица 13. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом гомогенизации высокого давления – **С. 76**
- Таблица 14. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом гомогенизации высокого давления – **С. 76**
- Таблица 15. Условия получения водосовместимой формы рифапентина методом ультразвуковой гомогенизации – **С. 77**
- Таблица 16. Характеристика водосовместимой формы рифапентина, полученной методом ультразвуковой гомогенизации – **С. 78**
- Таблица 17. Содержание рифапентина в образцах его водосовместимой формы, определенное спектрофотометрически и хроматографически – **С. 81**
- Таблица 18. Условия получения водосовместимой формы рифаксимины методом ультразвуковой гомогенизации – **С. 86**
- Таблица 19. Характеристика водосовместимой формы рифаксимины, полученной методом ультразвуковой гомогенизации – **С. 86**

- Таблица 20. Условия получения водосовместимой формы рифаксими́на методом наноосаждения – **С. 87**
- Таблица 21. Характеристика водосовместимой формы рифаксими́на, полученной методом наноосаждения – **С. 87**
- Таблица 22. Условия получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на – **С. 90**
- Таблица 23. Характеристика водосовместимых форм рифапентина и рифаксими́на – **С. 92**
- Таблица 24. Квалиметрическая оценка водосовместимой формы рифапентина и рифаксими́на на основе белков – **С. 93**
- Таблица 25. Получение и исследование водосовместимой формы рифапентина на основе Pluronic® F-68 – **С. 94**
- Таблица 26. Изучение влияния условий заморозки и состава криопротектора на характеристики водосовместимой формы рифапентина на основе ЧСА – **С. 98**
- Таблица 27. Масштабирование эксперимента по получению водосовместимой формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина – **С. 99**
- Таблица 28. Соотношение между общим содержанием антибиотика, содержанием антибиотика в водной фазе и содержанием белка в водосовместимых формах рифапентина и рифаксими́на – **С. 102**
- Таблица 29. Изучение тушения флуоресценции раствора человеческого сывороточного альбумина рифапенти́ном – **С. 104**
- Таблица 30. Изучение тушения флуоресценции раствора сукцини́лированного желатина рифапенти́ном – **С. 104**
- Таблица 31. Изучение тушения флуоресценции раствора казеината натрия рифапенти́ном – **С. 105**
- Таблица 32. Изучение тушения флуоресценции раствора казеината натрия рифаксими́ном – **С. 105**
- Таблица 33. Параметры связывания антибиотиков с белками – **С. 108**
- Таблица 34. Содержание микобактерий в органах мышей по окончании лечения – **С. 110**
- Таблица 35. Острая токсичность коллоидной формы рифапентина на мышах – **С. 113**
- Таблица 36. Динамика массы тела (г) крыс в хроническом эксперименте – **С. 117**
- Таблица 37. Общее количество лейкоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 117**
- Таблица 38. Абсолютное количество лимфоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 117**
- Таблица 39. Абсолютное количество моноцитов, эозинофилов и базофилов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 118**
- Таблица 40. Абсолютное количество гранулоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 118**

- Таблица 41. Общее количество эритроцитов ( $\times 10^{12}/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 118**
- Таблица 42. Содержание гемоглобина (г/л) в периферической крови крыс – **С. 119**
- Таблица 43. Показатель гематокрита (%) в периферической крови крыс – **С. 119**
- Таблица 44. Количество тромбоцитов ( $\times 10^9/\text{л}$ ) в периферической крови крыс – **С. 119**
- Таблица 45. Биохимические показатели сыворотки крови крыс на 1 сутки после курса – **С. 120**
- Таблица 46. Биохимические показатели сыворотки крови крыс на 15 сутки после курса – **С. 120**
- Таблица 47. Суточный диурез и клинический анализ мочи крыс на 1 сутки после курса – **С. 120**
- Таблица 48. Суточный диурез и клинический анализ мочи крыс на 15 сутки после курса – **С. 121**
- Таблица 49. Показатели электрокардиограммы крыс на 1 сутки после курса – **С. 121**
- Таблица 50. Показатели электрокардиограммы крыс на 15 сутки после курса – **С. 121**
- Таблица 51. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс на 1 сутки после курса – **С. 122**
- Таблица 52. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс на 15 сутки после курса – **С. 122**
- Таблица 53. Патоморфологические изменения внутренних органов крыс – **С. 123**

### **Рисунки**

- Рисунок 1. Структурные формулы рифамицинов – **С. 21**
- Рисунок 2. Схематическое изображение различных типов систем доставки антибиотиков, получаемых методами нанотехнологии – **С. 25**
- Рисунок 3. Сопоставление эффективности пероральной субстанции рифабутина и внутривенной формы на основе человеческого сывороточного альбумина – **С. 34**
- Рисунок 4. Спектры поглощения растворов рифапентина – **С. 61**
- Рисунок 5. Спектры поглощения растворов рифаксимины – **С. 61**
- Рисунок 6. Влияние человеческого сывороточного альбумина на спектры поглощения растворов рифапентина – **С. 62**
- Рисунок 7. Блок-схема лабораторной технологии получения водосовместимых форм рифапентина и рифаксимины на основе белков – **С. 71**
- Рисунок 8. Электрофореграмма образцов водосовместимой формы рифапентина на основе ЧСА в сравнении с исходным аптечным альбумином – **С. 80**
- Рисунок 9. Хроматограмма стандартного раствора рифапентина (концентрацией 50 мкг/мл) – **С. 82**

Рисунок 10. Хроматограмма образца водосовместимой формы рифапентина на основе человеческого сывороточного альбумина – **С. 82**

Рисунок 11. Спектр рифапентина, время удерживания ок. 2,1 мин – **С. 82**

Рисунок 12. Спектр примеси, время удерживания ок. 1,1 мин – **С. 83**

Рисунок 13. Спектр примеси, время удерживания ок. 2,5 мин – **С. 83**

Рисунок 14. Спектр примеси, время удерживания ок. 8,0 мин – **С. 83**

Рисунок 15. Скорость растворения субстанции рифапентина и его водосовместимой формы на основе человеческого сывороточного альбумина – **С. 84**

Рисунок 16. Сравнение эффектов повышения растворимости рифапентина и рифаксимины в воде – **С. 89**

Рисунок 17. Схематическое изображение структуры водосовместимых лекарственных форм на основе белков – **С. 102**

Рисунок 18. Калибровка для определения человеческого сывороточного альбумина методом капиллярного электрофореза ( $R^2 > 0,99$ ) – **С. 103**

Рисунок 19. Зависимость тушения флуоресценции человеческого сывороточного альбумина от концентрации рифапентина – **С. 106**

Рисунок 20. Зависимость тушения флуоресценции сукцинированного желатина от концентрации рифапентина – **С. 106**

Рисунок 21. Зависимость тушения флуоресценции казеината натрия от концентрации рифапентина – **С. 107**

Рисунок 22. Зависимость тушения флуоресценции казеината натрия от концентрации рифаксимины – **С. 107**

Рисунок 23. Количество КОЕ (lg) микобактерий *M. tuberculosis* H37Rv, высеваемых из органов мышей через 35-38 суток после завершения лечения – **С. 111**

Рисунок 24. Зависимость процента павших животных от дозы внутривенной формы рифапентина – **С. 114**

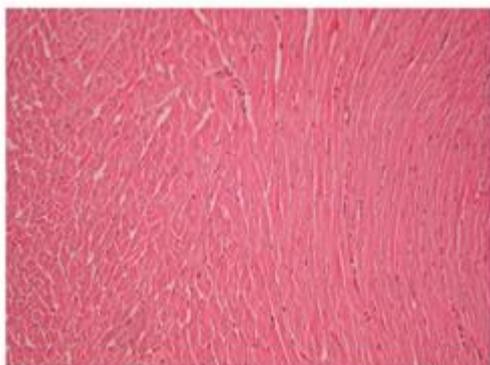
**ПРИЛОЖЕНИЕ А****Результаты патоморфологического исследования внутренних органов крыс**

Фото 1. Миокард крысы, интактный контроль (x 20)

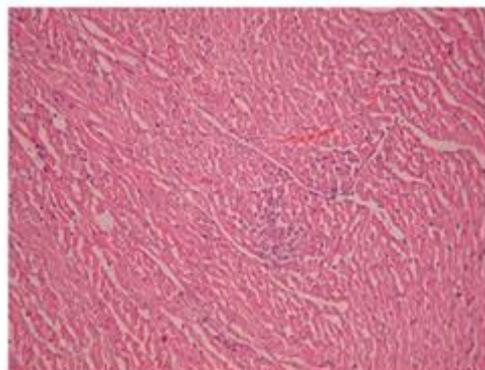


Фото 2. Миокард крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: умеренный отек интерстиция, мелкий очаг деструкции кардиомиоцитов (x 20)

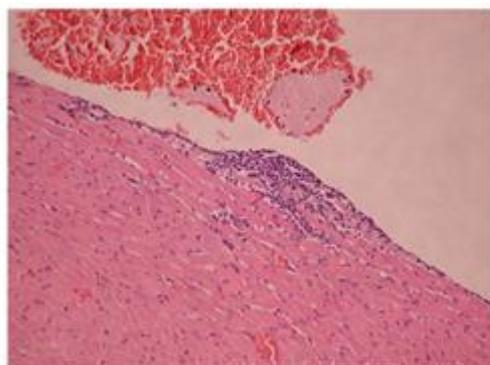


Фото 3. Миокард крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: лимфогистиоцитарный инфильтрат под эндокардом (x 20)

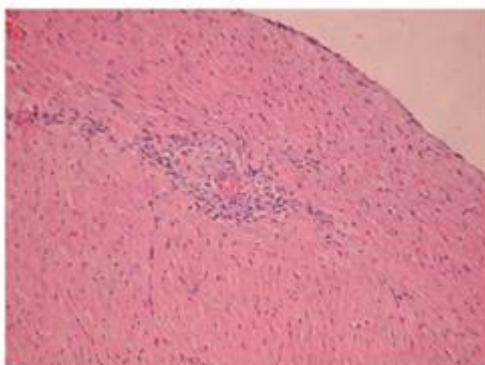


Фото 4. Миокард крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса; некроз кардиомиоцитов вокруг артерии (x 20)

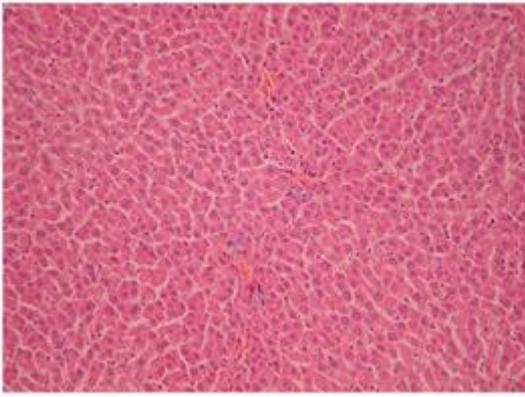


Фото 5. Печень крысы, интактный контроль (x 20)

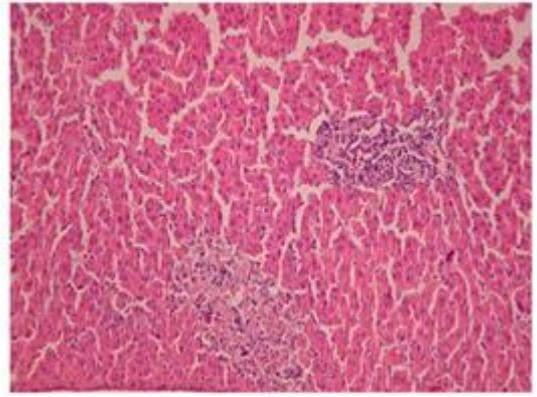


Фото 6. Печень крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаги микронекроза вблизи портального тракта и между портальным трактом и центральной веной (x 20)

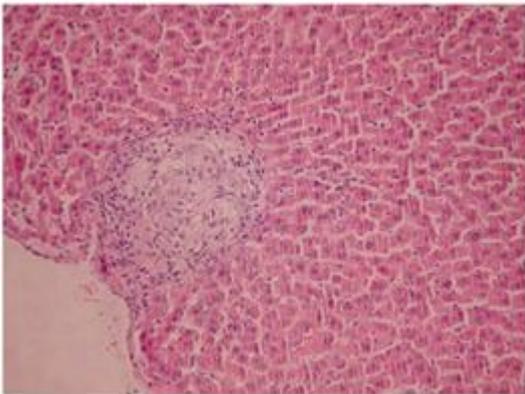


Фото 7. Печень крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: очаг микронекроза в стадии организации (x 20)

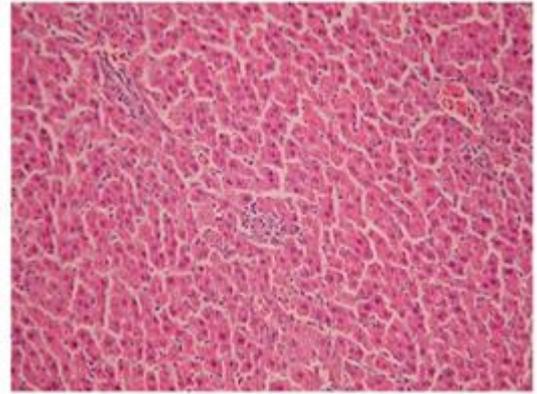


Фото 8. Печень крысы, Рпт 83 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг микронекроза между триадой и центральной веной (x 20)

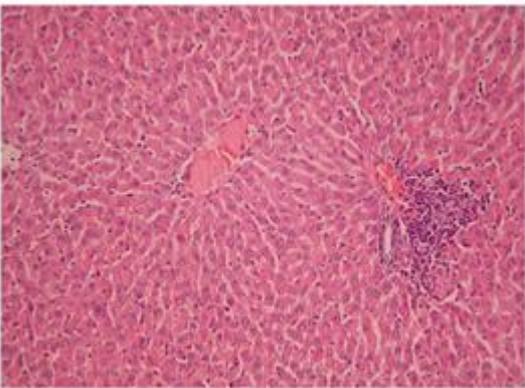


Фото 9. Печень крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг микронекроза вблизи портального тракта, купферовские клетки активны (x 20)

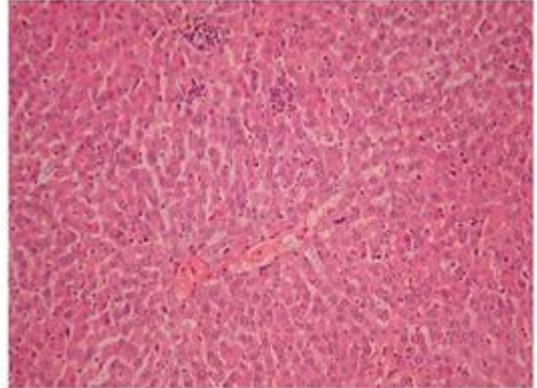


Фото 10. Печень крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: множественные мелкие очаги микронекроза между центральной веной и триадой, отек вокруг центральной вены (x 20)

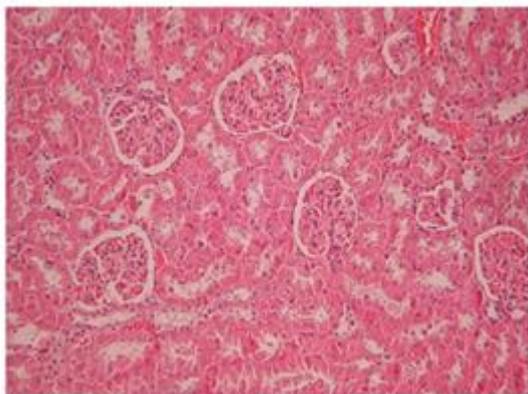


Фото 11. Почка крысы, интактный контроль, корковая зона (x 20)

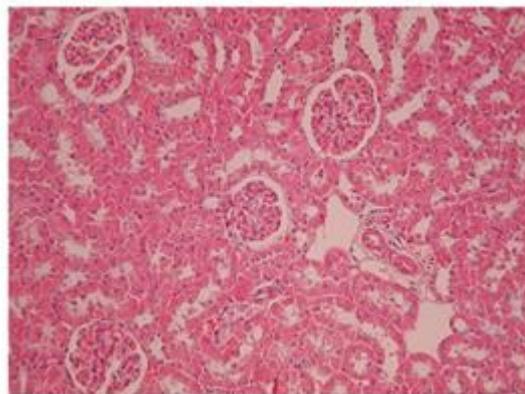


Фото 11а. Почка крысы, интактный контроль, юкстамедуллярная зона (x 20)

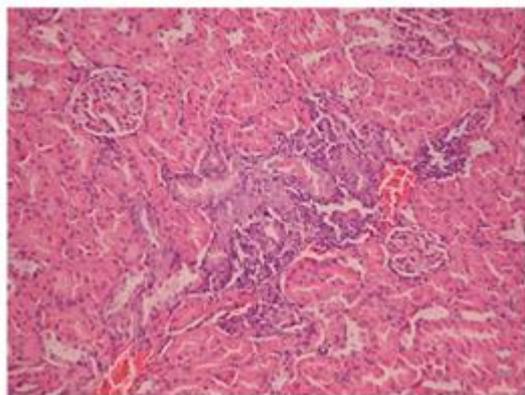


Фото 12. Почка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг некроза извитых канальцев вблизи сосуда корковой зоны (x 20)

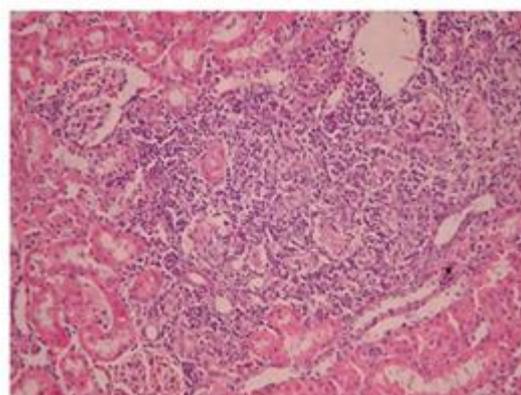


Фото 13. Почка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг некроза извитых канальцев вокруг сосуда юкстамедуллярной зоны (x 20)

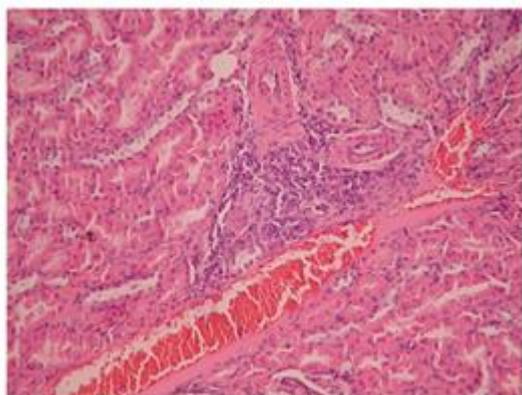


Фото 14. Почка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: крупный очаг некроза извитых канальцев с признаками организации в юкстамедуллярной зоне (x 20)

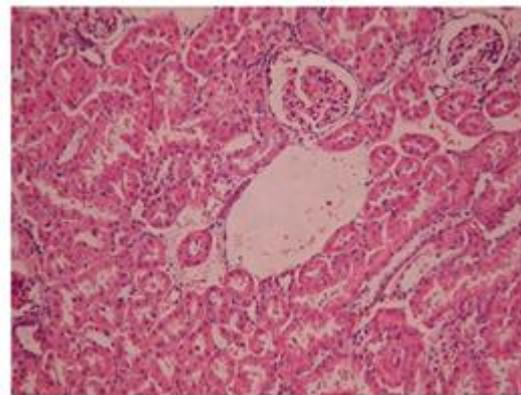


Фото 15. Почка крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг некроза извитых канальцев вблизи сосудистого пучка в юкстамедуллярной зоне (x 20)

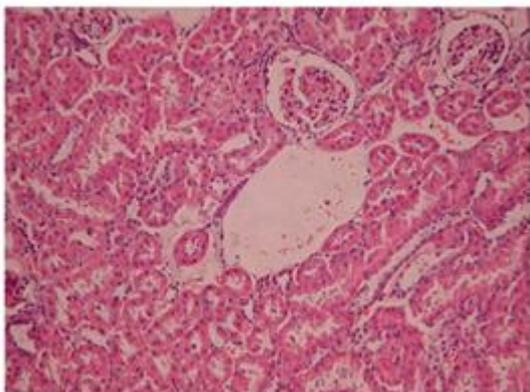


Фото 16. Почка крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: периваскулярный отек, просвет капсулы клубочков резко расширен, под капсулой – отложения белковых масс (x 20)

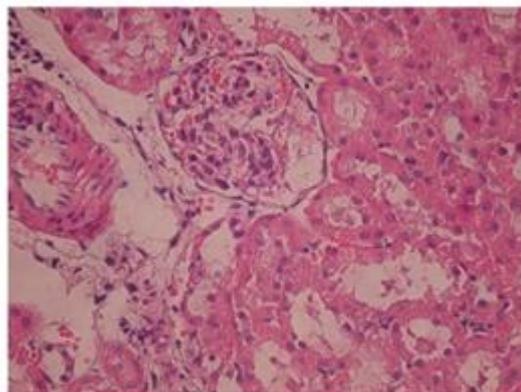


Фото 17. Почка крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаговая атрофия капиллярной сети в клубочке юкстамедуллярной зоны (x 40)

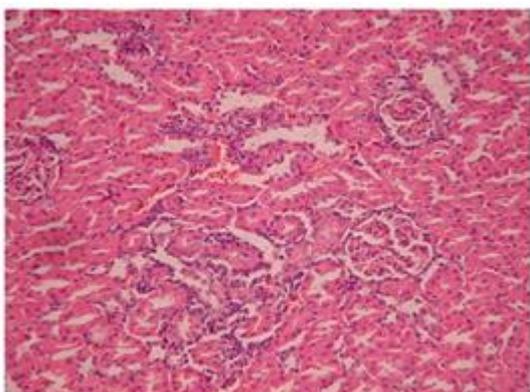


Фото 18. Почка крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: множественные мелкие очаги некроза извитых канальцев с признаками организации, утолщение париетального листка капсулы клубочков, рубцующийся клубочек (x 20)

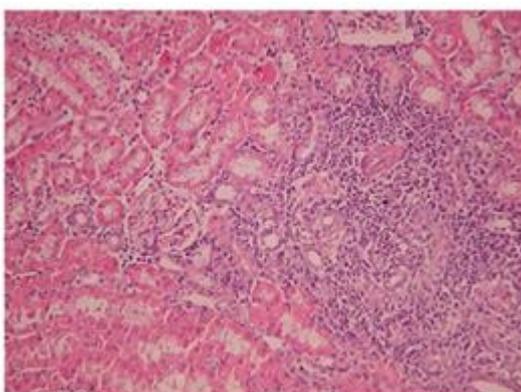


Фото 19. Почка крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: обширный очаг некроза извитых канальцев юкстамедуллярной зоны в стадии организации (x 20)

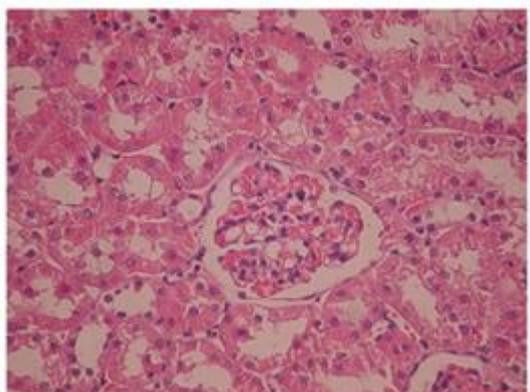


Фото 20. Почка крысы, ЧСА-Рпт 9 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: просвет капсулы клубочка расширен, эндотелий капилляров резко вакуолизирован (x 40)

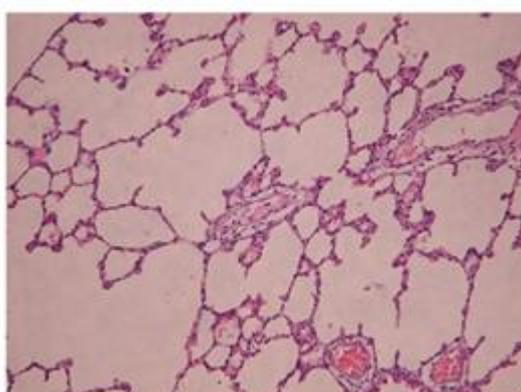


Фото 21. Легкое крысы, интактный контроль (x 20)

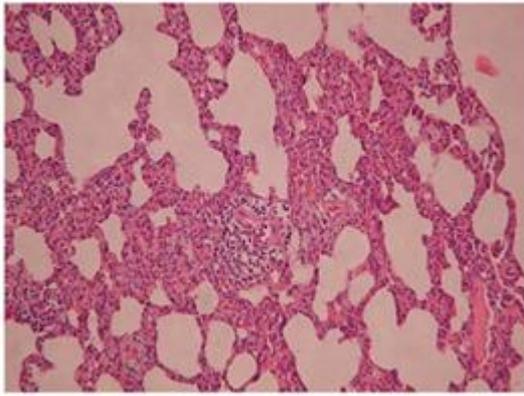


Фото 22. Легкое крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаговое утолщение альвеолярных перегородок, активация альвеолоцитов II порядка, лимфогистиоцитарная инфильтрация периваскулярного пространства (x 20)

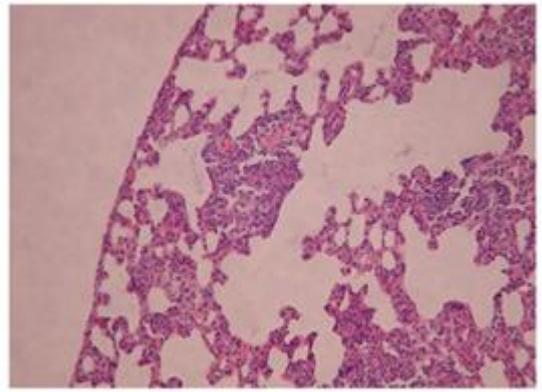


Фото 23. Легкое крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: множественные мелкие очаги фиброза в области утолщения альвеолярных перегородок (x 20)

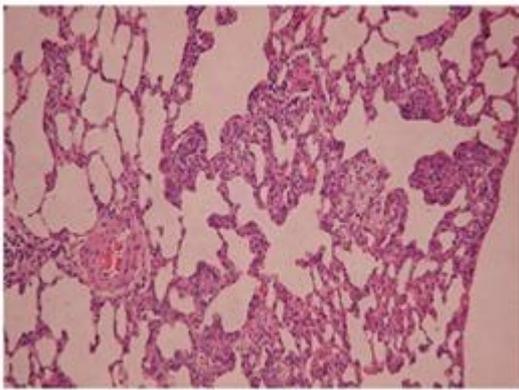


Фото 24. Легкое крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаговое утолщение альвеолярных перегородок, активация альвеолоцитов II порядка, ксантомные клетки в просвете альвеол (x 20)

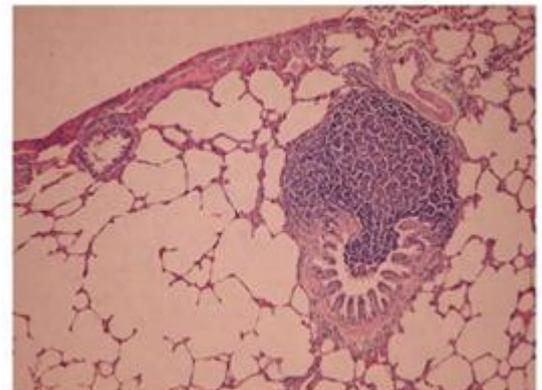


Фото 25. Легкое крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: лимфоидный фолликул с центром размножения, очаговое замещение мышечной оболочки бронха лимфоидной тканью, лимфоциты и клетки эпителия в просвете бронха, фиброз плевры (x 10)

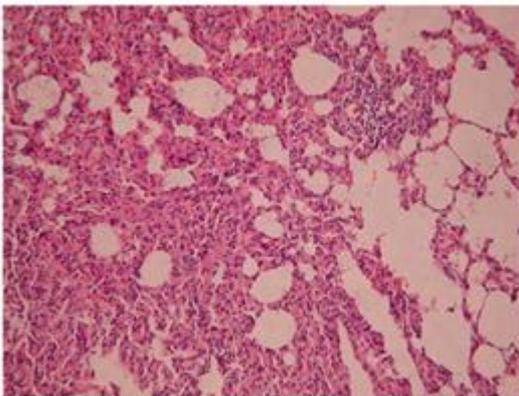


Фото 26. Легкое крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: крупный очаг фиброза (x 20)

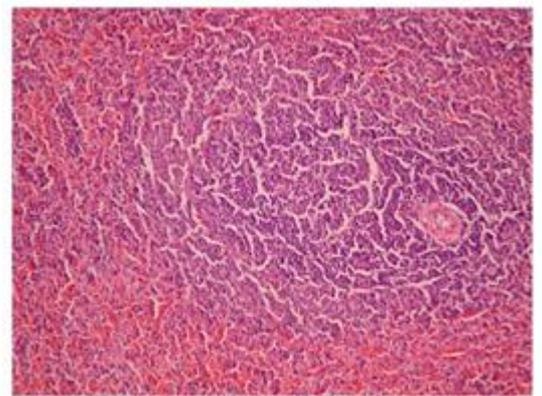


Фото 27. Селезенка крысы, интактный контроль (x 20)

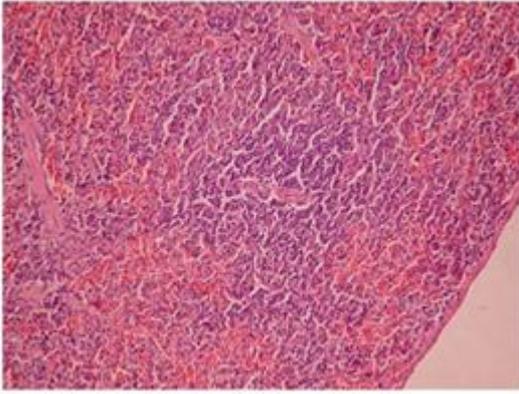


Фото 28. Селезенка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: небольшой фолликул без центра размножения (x 20)

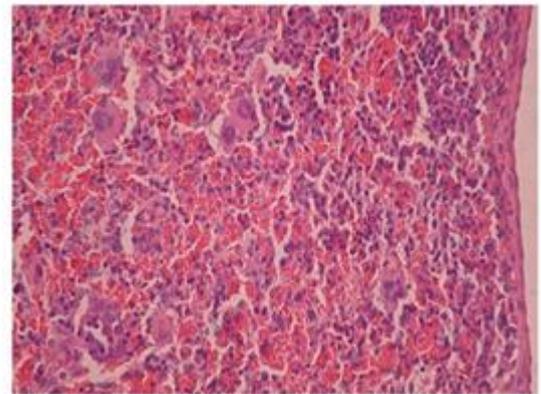


Фото 29. Селезенка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: обилие мегакариоцитов и мегакариобластов, очаги экстрамедуллярного кроветворения (x 40)

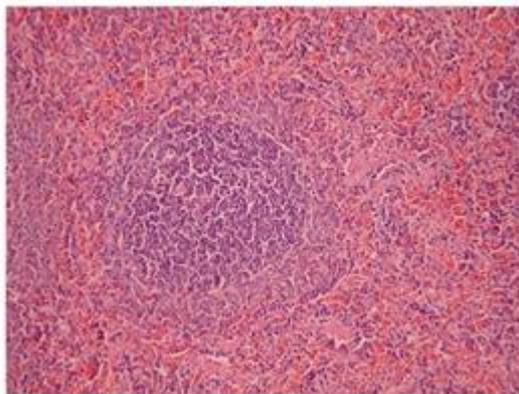


Фото 30. Селезенка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: фолликул средних размеров правильной формы (x 20)

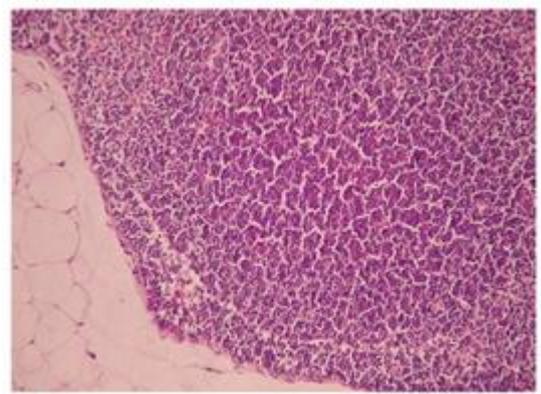


Фото 31. Лимфоузел крысы, интактный контроль (x 20)

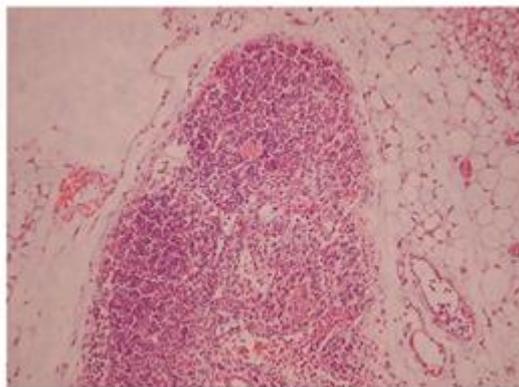


Фото 32. Лимфоузел крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: умеренная атрофия лимфоидной ткани фолликула, глубокая – в интерфолликулярной зоне (x 20)

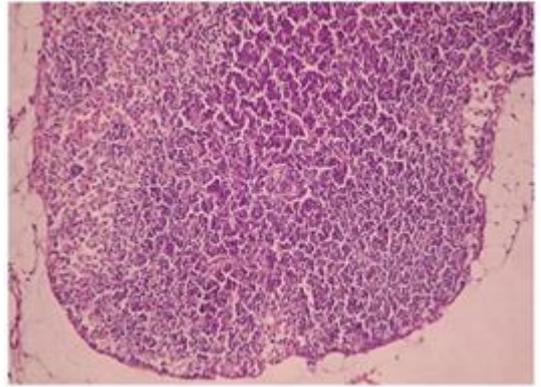


Фото 33. Лимфоузел крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: умеренная атрофия лимфоидной ткани фолликула, венулы с высоким эндотелием, обилие макрофагов в синусах (x 20)

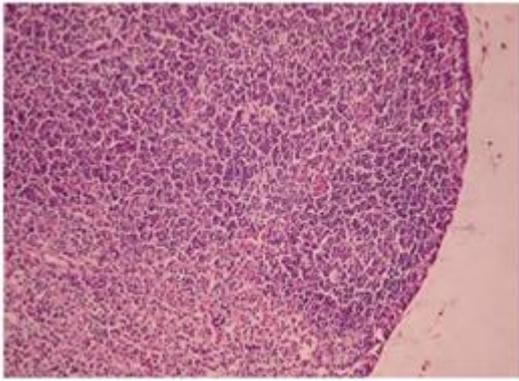


Фото 34. Лимфоузел крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: фолликул с центром размножения (x 20)

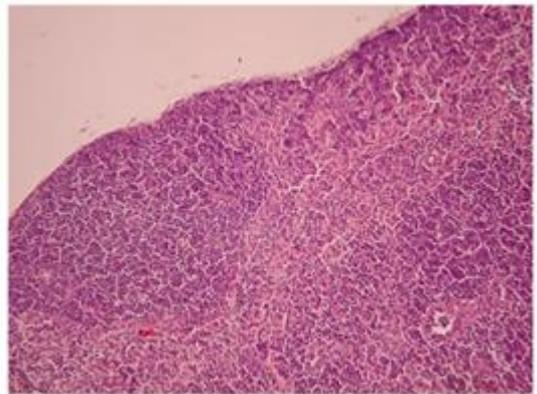


Фото 35. Лимфоузел крысы, ЧСА-Рпт 11 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: фиброз стромы под капсулой корковой зоны (x 20)

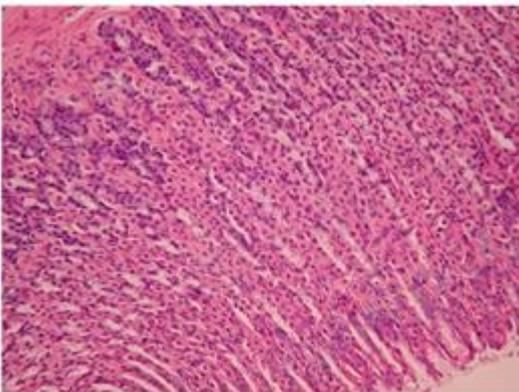


Фото 36. Желудок крысы, интактный контроль (x 20)

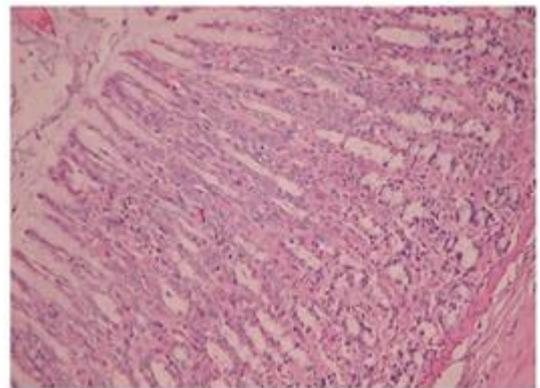


Фото 37. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: глубокая атрофия эпителия желез с замещением покровно-ямочным эпителием, в железах преобладают обкладочные клетки (x 20)

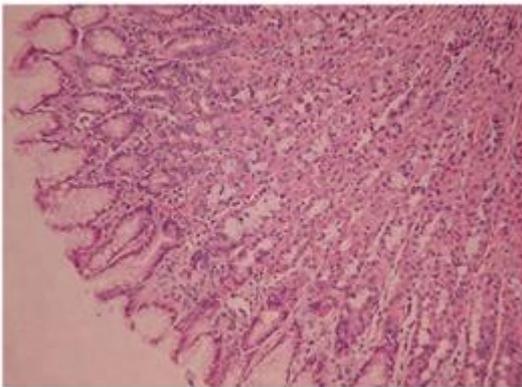


Фото 38. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: избыточное слизиобразование в клетках покровно-ямочного эпителия (x 20)

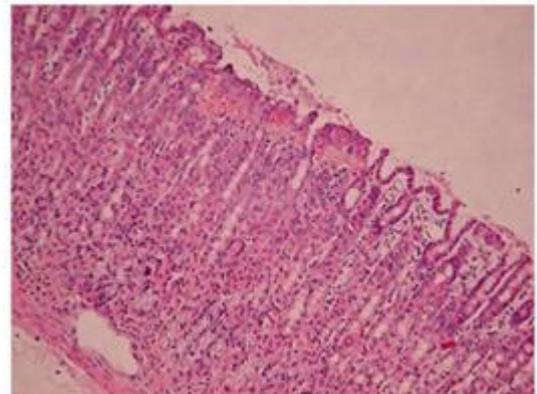


Фото 39. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: эрозия (x 20)

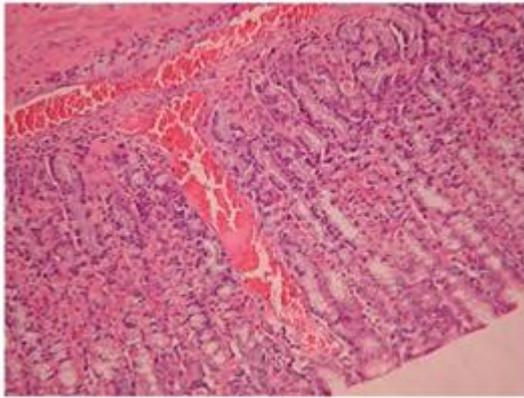


Фото 40. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: кровоизлияние в слизистой оболочке (x 20)

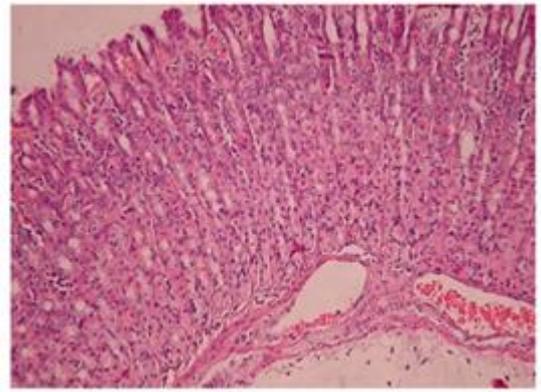


Фото 41. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: кровоизлияние под покровно-ямочным эпителием, сосуды между мышечной пластинкой и мышечной оболочкой резко расширены (x 20)

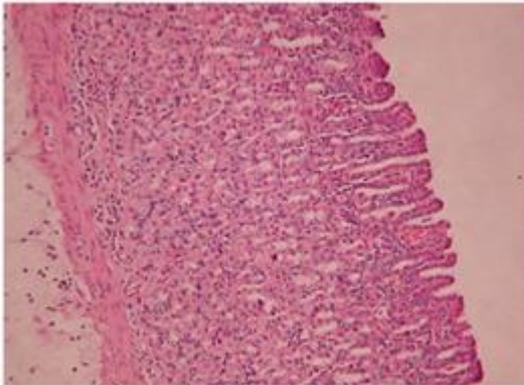


Фото 42. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: истончение слизистой оболочки (x 20)

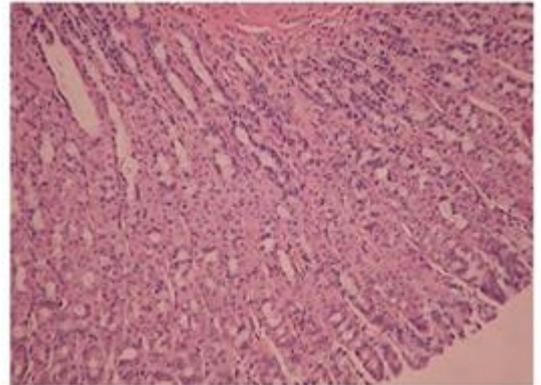


Фото 43. Желудок крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: кисты, выстланные плоским или кубическим эпителием в области дна и тела желез (x 20)

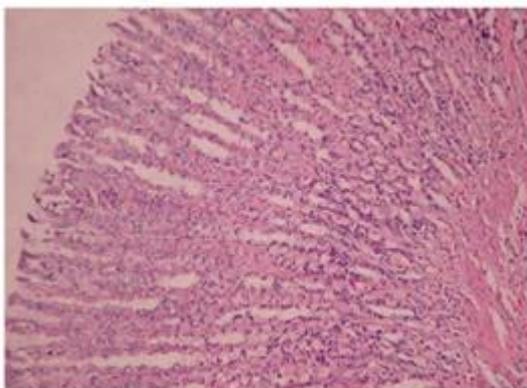


Фото 44. Желудок крысы, Рпт 83 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: умеренная атрофия слизистой оболочки (x 20)

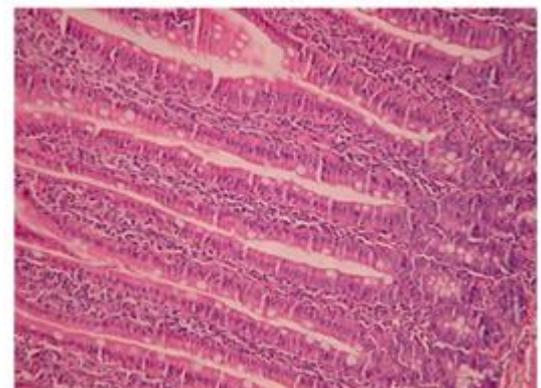


Фото 45. Тощая кишка крысы, интактный контроль (x 20)

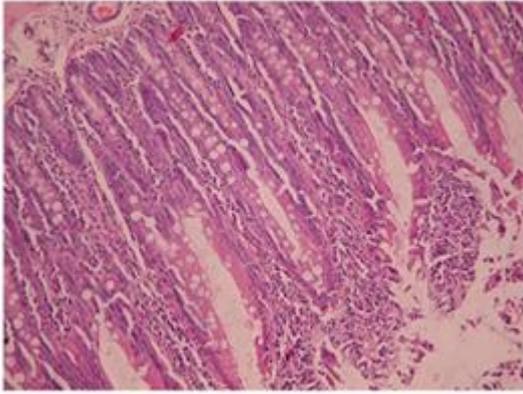


Фото 46. Тощая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: деструкция цилиндрического эпителия и стромы ворсин в области верхушки, слущивание эпителия ворсин в просвет кишки (x 20)

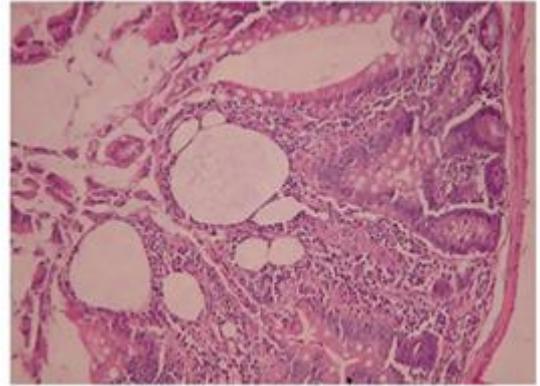


Фото 47. Тощая кишка крысы: Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: резкое кистообразное расширение капилляров в строме ворсин, замещение эпителия крипт элементами собственной пластинки слизистой оболочки (x 20)

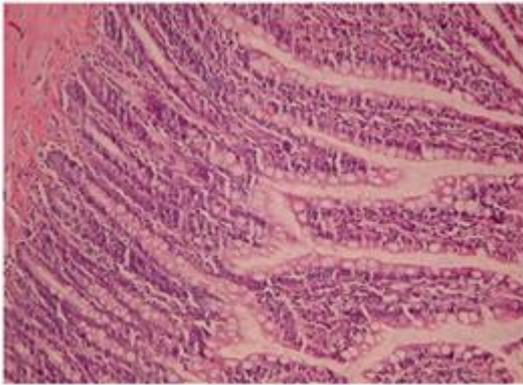


Фото 48. Тощая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: обилие бокаловидных клеток, мономорфный кубический эпителий в криптах (x 20)



Фото 49. Тощая кишка крысы, Рпт 83 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: кистообразное расширение капилляров стромы ворсин (x 20)

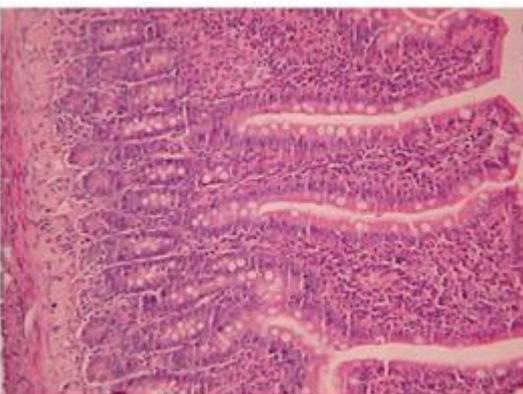


Фото 50. Подвздошная кишка крысы, интактный контроль (x 20)

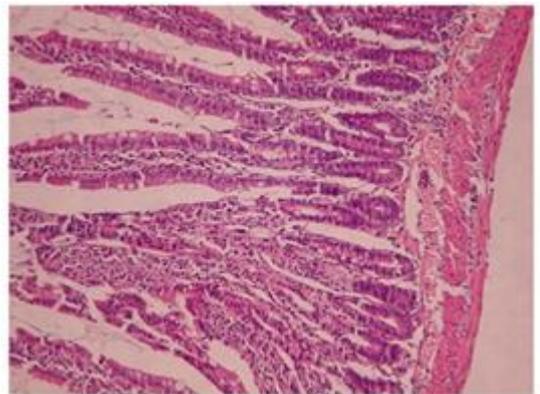


Фото 51. Подвздошная кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: очаг деструкции эпителия желез, мономорфный кубический эпителий в криптах (x 20)

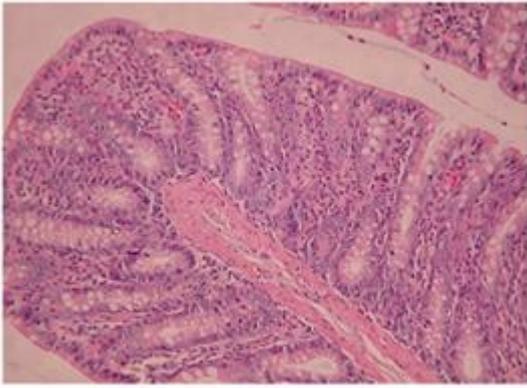


Фото 52. Толстая кишка крысы, интактный контроль (x 20)

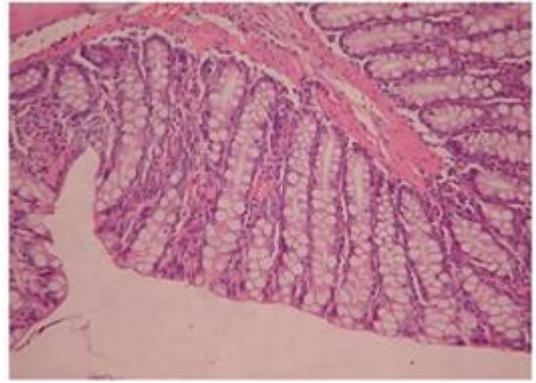


Фото 53. Толстая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: увеличение числа бокаловидных клеток и усиление в них слизиобразования (x 20)

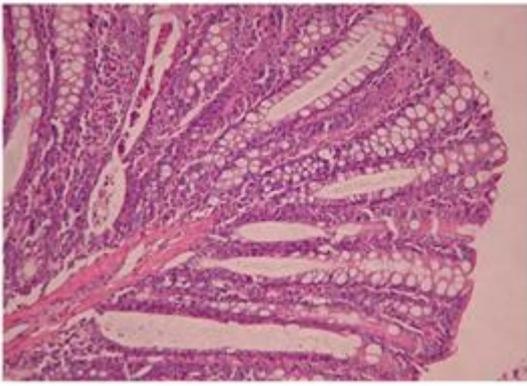


Фото 54. Толстая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: клеточный дендрит в резко расширенном просвете желез (x 20)

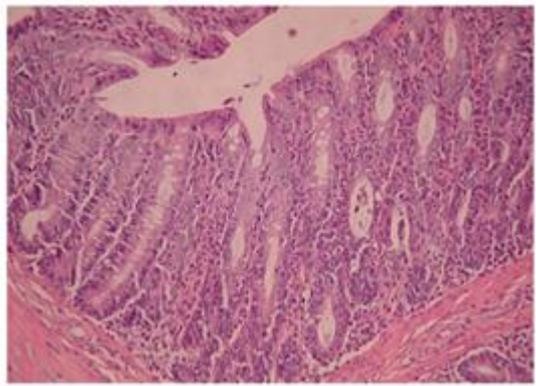


Фото 55. Толстая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: кисты, содержащие клеточный детрит (x 20)

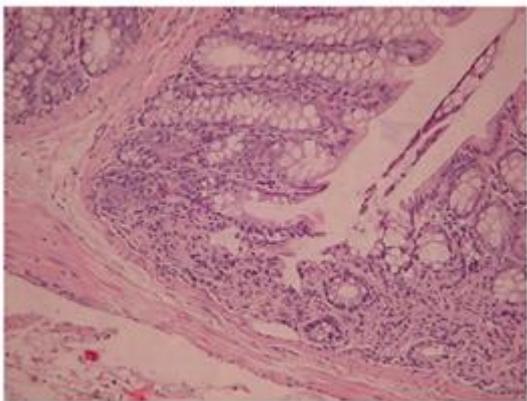


Фото 56. Толстая кишка крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: очаг некроза слизистой оболочки в стадии организации (x 20)

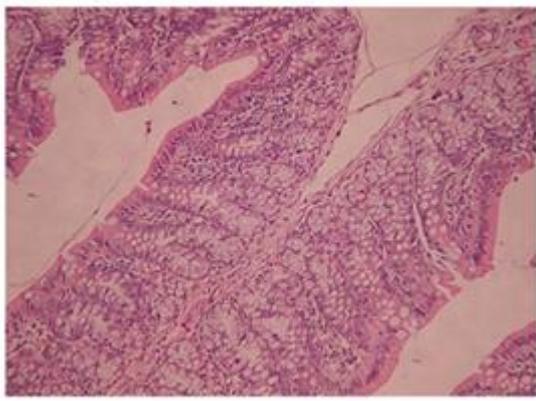


Фото 57. Толстая кишка крысы, Рпт 83 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: увеличение количества бокаловидных клеток в слизистой оболочке (x 20)

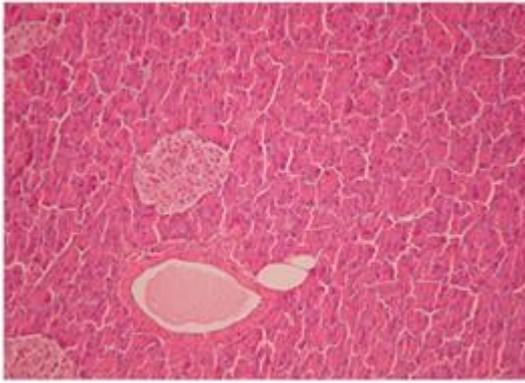


Фото 58. Поджелудочная железа крысы, интактный контроль (x 20)

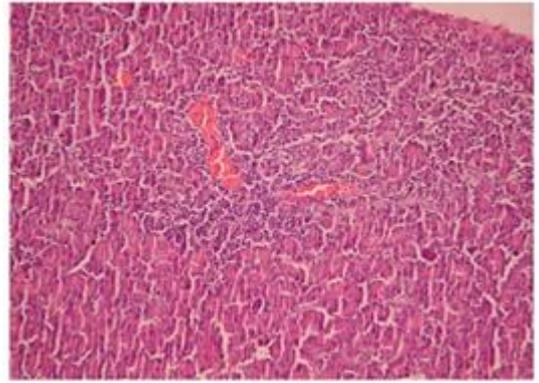


Фото 59. Поджелудочная железа крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: полнокровие капилляров, очаги некроза ацинусов вблизи сосудов (x 20)

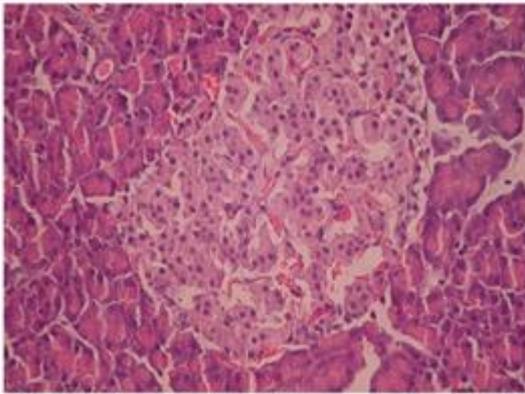


Фото 60. Поджелудочная железа крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: резкое расширение просвета капилляров, деструкция отдельных  $\beta$ -клеток в островках Лангерганса (x 40)

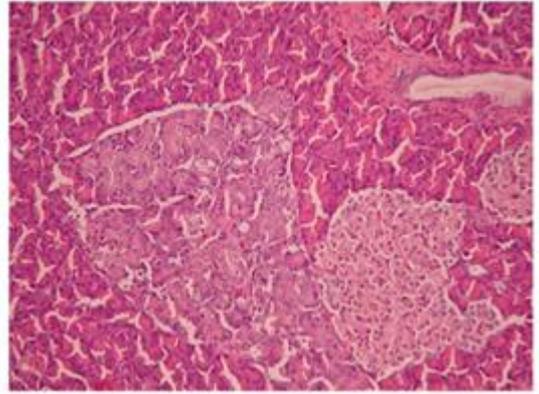


Фото 61. Поджелудочная железа крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: некроз дольки в стадии организации (x 20)

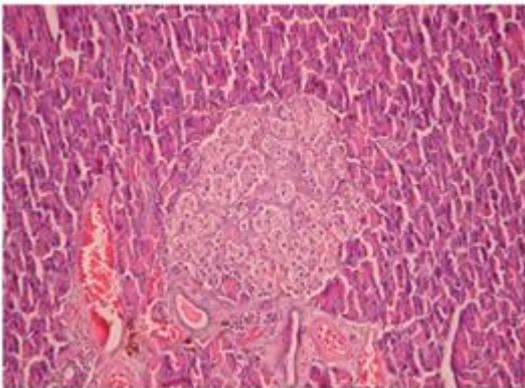


Фото 62. Поджелудочная железа крысы, Рпт 167 мг/кг x 15, 15-е сутки после курса: крупный островок Лангерганса с признаками склероза, отложения гемосидерина вокруг островка (x 20)

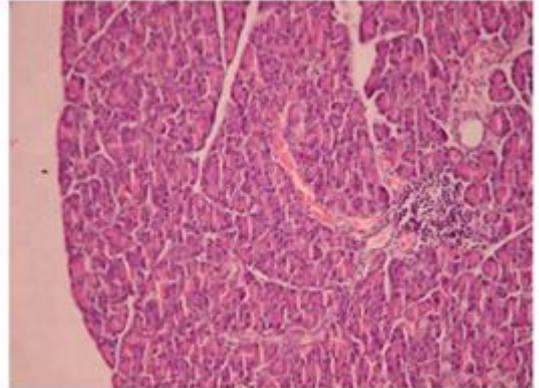


Фото 63. Поджелудочная железа крысы, Рпт 83 мг/кг x 15, 1-е сутки после курса: мелкий очаг некроза в экзокринной части железы (x 20)