

## Оценка безопасности наноразмерных форм рифабутина

О.И. Авдеева<sup>1</sup>, М.Н. Макарова<sup>1</sup>, О.О. Максименко<sup>2</sup>,  
Н.С. Осипова<sup>2</sup>, В.Ю. Балабаньян<sup>3</sup>, С.Э. Гельперина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»; Российская Федерация, 188663,  
Ленинградская обл., Всеволожский район, гп. Кузьмолровский, к. 245;

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», Российская Федерация,  
141400, Московская обл., Химки, ул. Рабочая, д. 2а, стр. 31, пом.21;

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

**Авдеева Ольга Ильинична** – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Тел.: +7 (812) 603-24-32; +7 (921) 415-50-77. E-mail: avdeeva.oi@doclinika.ru

**Макарова Марина Николаевна** – доктор медицинских наук, директор АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Тел.: +7 (812) 603-24-32; +7 (911) 270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

**Балабаньян Вадим Юрьевич** – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Тел.: +7 (495) 932-88-14. E-mail: bal.pharm@mail.ru

**Гельперина Светлана Эммануиловна** – доктор химических наук, зав. Лабораторией систем доставки лекарственных веществ, ООО «Технология лекарств». Тел.: +7 (916) 070-03-93, E-mail: svetlana.gelperina@gmail.com

**Максименко Ольга Олеговна** – кандидат химических наук, зам. зав. Лабораторией систем доставки лекарственных веществ, ООО «Технология лекарств». Тел.: +7 (903) 131-78-86. E-mail: omnews@mail.ru

**Осипова Надежда Сергеевна** – научный сотрудник Лаборатории систем доставки лекарственных веществ, ООО «Технология лекарств». Тел.: +7 (903) 627-40-85. E-mail: kompass@yandex.ru

**Введение.** Одним из способов снижения токсичности антибиотиков является их преимущественная доставка в инфицированные органы и ткани, что может быть достигнуто различными системами доставки. Особый интерес представляют полимерные наночастицы, сочетающие такие важные для носителей свойства, как стабильность и высокая емкость в отношении широкого спектра лекарственных веществ.

**Цель исследования** – определение токсических, максимально переносимых и летальных доз наноразмерных форм рифабутин-а.

**Материал и методы.** Водосовместимые инъекционные формы получали путем включения рифабутин-а в состав полилактидных наночастиц (Rb-PLGA) или солюбилизации человеческим сывороточным альбумином (Rb-HSA). Эксперименты проводили на самцах и самках половозрелых аутбредных крыс и мышей, содержащихся в стандартных условиях вивария.

**Результаты.** Наноразмерные формы рифабутин-а Rb-HSA и Rb-PLGA представляют собой пригодные для внутривенного введения коллоидные наносuspензии с концентрацией рифабутин-а около 5 мг/мл, что в 25 раз превышает растворимость субстанции. По показателям острой токсичности наноразмерные формы рифабутин-а можно отнести по ГОСТу 12.1.007-76 к 3-му классу умеренно токсичных веществ и к 4-му классу мало токсичных веществ по классификации К.К. Сидорова. Основные органы-мишени токсического действия препаратов – центральная нервная система, печень и легкие. При внутривенном введении крысам высоких доз Rb-PLGA наблюдалось повышение локомоторной активности, что может быть связано с псевдоаллергической реакцией на введение коллоидной формы.

**Заключение.** Благодаря нанотехнологическому подходу удалось получить пригодные для внутривенного введения наноразмерные формы трудно растворимого антибиотика рифабутин-а. По результатам комплексного изучения параметров острой токсичности наноразмерные формы рифабутин-а относятся к умеренно токсичным веществам (3-й класс по ГОСТу 12.1.007-76).

**Ключевые слова:** рифабутин, наноразмерные формы, токсичность, крысы, мыши.

**Для цитирования:** Авдеева О.И., Макарова М.Н., Максименко О.О., Осипова Н.С., Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. Оценка безопасности наноразмерных форм рифабутин-а. Фармация, 2018; 67 (5): 48–56. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-09>.

## THE SAFETY ASSESSMENT OF RIFABUTIN NANOFORMULATIONS

O.I. Avdeeva<sup>1</sup>, M.N. Makarova<sup>1</sup>, O.O. Maksimenko<sup>2</sup>, N.S. Osipova<sup>2</sup>, V.Yu. Balabaniyan<sup>3</sup>, S.E. Gelperina<sup>2</sup><sup>1</sup>Pharmacy House Research-and-Production Association; 245, Kuzmolovsky Urban-Type Settlement, Vsevolozhsky District, Leningrad Region 188663, Russian Federation;<sup>2</sup>ООО "Tekhnologiya Lekarstv (Drug Technology), 2a, Rabochaya St., Build. 31, Room 21, Khimki, Moscow Region 141400, Russian Federation;<sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russian Federation

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

**Avdeeva Olga Ilinichna**, candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Researcher PHARMACY HOUSE Research-and-Production Association. Tel.: +7 (812) 603-24-32; +7 (921) 415-50-77. E-mail: avdeeva.oi@doclinika.ru**Makarova Marina Nikolaevna** – doctor of medical sciences, director PHARMACY HOUSE Research-and-Production Association. Tel.: +7 (812) 603-24-32; +7 (911) 270-27-51. E-mail: makarova.mn@doclinika.ru**Balabaniyan Vadim Yrievich** – D.Sc., docent M.V. Lomonosov Moscow State University Department of pharmaceutical technology Faculty of Basic medicine. Tel.: +7 (495) 932-88-14. E-mail: bal.pharm@mail.ru**Gelperina Svetlana Emmanuilovna** – DrSci, Head of Laboratory of Drug Delivery Systems, Drugs Technology, Ltd. Tel.: +7 (916) 070-03-93. E-mail: svetlana.gelperina@gmail.com**Maksimenko Olga Olegovna** – Deputy Head of Laboratory of Drug Delivery Systems, Drugs Technology, Ltd. Tel.: +7 (903) 131-78-86. E-mail: omnews@mail.ru**Osipova Nadezhda Sergeevna** – Researcher, Laboratory of Drug Delivery Systems, Drugs Technology, Ltd. Tel.: +7 (903) 6274085. E-mail: kompacc@yandex.ru

## SUMMARY

**Introduction.** One of the ways to reduce the toxicity of antibiotics is to deliver the latter primarily to infected organs and tissues, which can be achieved by different drug delivery systems. Of particular interest are polymer nanoparticles that combine the properties of importance for carriers, such as stability and high capacity for a wide range of drugs.**Objective:** to determine the toxic, maximum tolerated, and lethal doses of rifabutin nanoformulations.**Material and methods.** Water-compatible injectable formulations were obtained by incorporation of rifabutin in polylactide nanoparticles (Rb-PLGA) or by its solubilization with human serum albumin (Rb-HSA). Experiments were carried out on male and female sexually mature outbred rats and mice, which were kept under standard vivarium conditions.**Results.** The rifabutin nanoformulations Rb-HSA and Rb-PLGA are suitable for the intravenous injection of colloidal nanosuspensions wherein the concentration of rifabutin is about 5 mg/ml, which is 25 times more than the solubility of the substance. According to the level of acute toxicity, rifabutin nanoformulations can be assigned to GOST 12.1.007-76, Class 3 (moderately toxic substances) and to Class 4 (lowly toxic substances) as classified by K.K. Sidorov. The major target organs of toxicity for drugs are the central nervous system, liver, and lung. After intravenous injection of high-dose Rb-PLGA in rats there was an increase in locomotor activity, which may be associated with a pseudoallergic reaction to the administration of a colloidal formulation.**Conclusion.** The application of a nanotechnological approach could obtain suitable intravenous nanoformulations of the insoluble antibiotic rifabutin. The results of a comprehensive study of acute toxicity parameters refer rifabutin nanoformulations to as moderately toxic substances (Class 3 according to GOST 12.1.007-76).**Key words:** rifabutin, nanoformulations, toxicity, rats, mice.**For citation:** Avdeeva O.I., Makarova M.N., Maksimenko O.O., Osipova N.S., Balabaniyan V.Yu., Gelperina S.E. The safety assessment of rifabutin nanoformulations. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 67 (5): 48–56. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-09>.

## Введение

Рифабутин (РБ) полусинтетический антибиотик группы рифамицинов, широко применяющийся в терапии туберкулезной инфекции, вызванной *Mycobacterium tuberculosis*. По спектру и механизму действия РБ аналогичен рифампицину – противотуберкулезному препарату I ряда, но существенно превосходит его по ряду фармакодинамических и фармакокинетических свойств: он лучше проникает в ткани и жидкости организма, характеризуется большим объемом распределения, более высоким соотношением концентраций ткани/кровь, более длинным периодом полувыведения (продолгованное действие) [1, 2]. Кроме того, РБ превышает рифам-

пицинов по активности в отношении клинических штаммов атипичных микобактерий, в том числе *M. avium-intracellulare complex (MAC)*, *M. kansasii*, *M. leprae* и др. [1].

РБ – препарат выбора, при лечении туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией, которым необходима антиретровирусная терапия. В сравнении с рифампицином РБ является менее сильным индуктором ферментной системы цитохрома Р450 печени и в меньшей степени влияет на фармакокинетику антиретровирусных препаратов, что облегчает клиническое ведение таких пациентов [3].

При пероральном приеме РБ подвергается значительному первичному метаболизму в пече-

ни и быстро выводится с желчью, в связи с чем его биодоступность составляет всего 20% [2]. Однако инъекционных форм РБ не существует: препарат выпускается только в виде таблеток и капсул (Микобутин®, Pfizer; Рифабутин-Ферейн и пр), что связано, очевидно, с низкой растворимостью антибиотика в воде – всего около 0,2 мг/мл [4]. В то же время инъекционная форма РБ, возможно, позволит расширить спектр его применения, в частности при выраженных побочных эффектах в отношении ЖКТ или при затруднении перорального приема. Нами были разработаны 2 наноразмерные коллоидные формы РБ, пригодные для внутривенного введения. Одна из форм основана на включении РБ в состав полилактидных наночастиц (Rb-PLGA), другая – на солюбилизации РБ человеческим сывороточным альбумином (Rb-HSA).

Цель данного исследования – определение токсических, максимально переносимых и летальных доз наноразмерных форм РБ – Rb-PLGA и Rb-HSA при однократном внутривенном введении самцам и самкам аутбредных крыс и внутрибрюшинном введении самцам и самкам аутбредных мышей.

### **Материал и методы**

*Наноразмерные формы рифабутина.* Для получения наночастиц PLGA, нагруженных РБ (форма Rb-PLGA) полимер (Resomer® 502H, Evonik Rohm GmbH, Германия) и субстанцию РБ (Luohe Nanjiesun Pharmaceutical Group Pharmacy Co., Ltd., Китай) растворяли в дихлорметане; органическую фазу вводили в 1% водный раствор HSA, затем смесь эмульгировали под давлением.

Форму Rb-HSA получали наноосаждением, добавляя раствор РБ в этаноле к 3% водному раствору HSA. После удаления органических растворителей суспензии лиофилизировали с добавлением криопротектора (1% маннита). Содержание РБ определяли с помощью ВЭЖХ, размеры частиц методом фотонной корреляционной спектроскопии (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Великобритания).

*Исследование токсичности* выполнено в соответствии с принципами GLP и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных [5]. Эксперименты проводили на самцах и самках половозрелых аутбредных крыс и мышей, препараты вводили крысам внутривенно (в/в) и мышам внутрибрюшинно (в/б). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Масса животных к началу эксперимента составляла

для крыс 200–300 г, для мышей 20–30 г. Количество животных в эксперименте (по 5 самцов и 5 самок в каждой группе) было достаточным для статистической обработки полученных данных и минимальным для соблюдения биоэтических принципов (заключение биоэтической комиссии 1.32/13).

Согласно данным литературы, при внутривенном введении ЛД<sub>50</sub> рифабутина крысам в дозе 51 мг/кг [6], сведений о токсических и летальных дозах при внутрибрюшинном введении в доступных базах данных не обнаружено. В ходе исследования были протестированы дозы 25, 50, 75, 100, 125 мг/кг при внутривенном введении крысам и 50, 100, 200, 400 и 800 мг/кг – при внутрибрюшинном введении мышам. Также были сформированы 2 контрольные группы каждого вида животных: в 1-й группе однократно был введен носитель в объеме, равном объему введения максимальной дозы; во 2-й – наночастицы PLGA, не содержащие РБ (плацебо), в дозе, соответствующей максимальной дозе Rb-PLGA. Максимальная концентрация при внутривенном введении – 5 мг/мл, скорость введения при внутривенном введении составила 0,5 мл/мин. Объем введения для обоих видов животных не превысил допустимый [7].

Выбор путей введения препаратов соответствовал их клиническому применению (внутривенный – для крыс), и альтернативный – для более полной оценки профиля безопасности (внутрибрюшинный – для мышей).

Период наблюдения после однократного введения составил 30 дней, согласно рекомендациям для исследования наноразмерных лекарственных форм [8]. В ходе эксперимента масса тела животных регистрировалась непосредственно перед началом исследования, и далее – ежедневно. Индивидуальное поведение каждого животного изучали в тесте «Открытое поле» на 30-й день после однократного введения. Плановую эвтаназию проводили на 31-й день исследования после однократного введения. Эвтаназию осуществляли, помещая животных в CO<sub>2</sub>-камеру, далее проводили некропсию с последующим макроскопическим анализом внутренних органов. Параллельно с этим взвешивали внутренние органы с целью установления процентного соотношения массы каждого органа к массе тела животного. Выполняли гистологический анализ органов, макроскопическое изучение которых выявило изменения в печени и легких. Для гистологического исследования ткани внутренних

органов очищали, заливали в парафин, нареза-ли, окрашивали гематоксилином и эозином и микроскопировали.

Статистический анализ выполняли с помо-щью пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Различия были определены при уровне значимости 0,05.

### Результаты и обсуждение

После восстановления лиофилизатов в воде обе наноразмерные формы Rb-HSA и Rb-PLGA образовывали устойчивые коллоидные суспензии с концентрацией РБ около 5 мг/мл, что в 25 раз превышало растворимость РБ в воде. Средний размер частиц Rb-PLGA составлял  $100 \pm 13$  нм. Степень включения РБ в наночастицы – 85–90%.

Летальные эффекты, а также установленные летальные и токсические дозы представле-ны в табл. 1, 2. По показателям острой ток-сичности, при обоих путях введения препараты Rb-HSA и Rb-PLGA можно отнести по классифи-кации ГОСТ 12.1.007-76 к 3-му классу умеренно токсичных веществ [9], к 4-му классу опасности по классификации GHS [9] и к 4-му классу мало токсичных веществ по классификации Сидоро-ва К.К. [10].

Как показали результаты токсикологическо-го исследования, значение  $LD_{50}$  после однократ-

ного внутривенного введения Rb-HSA крысам составило 97,7–98,5 мг/кг. В группах крыс, по-лучавших Rb-PLGA, максимально переносимая доза – 100 мг/кг. По данным Brughera и соавт.,  $LD_{50}$  субстанции РБ при внутривенном введении крысам – 51–53 мг/кг [11]. Таким образом, обе лекарственные формы проявили значительно меньшую токсичность по сравнению с субстан-цией антибиотика.

У крыс картина интоксикации носила яркий и стремительный характер после внутривенного введения препаратов в средне-токсических и мак-симальных дозах. Наблюдали значительное угне-тение общего состояния, взъерошенность, одыш-ку с kloкочущими хрипами в течение 1,5–2 ч после введения, побледнение конечностей, судо-роги и гибель части или всех экспериментальных животных в группах. После внутрибрюшинного введения мышам зарегистрирована схожая кар-тина интоксикации, но отсроченная во времени. Причиной гибели животных, получивших препа-раты внутривенно, стала острая сердечная недо-статочность с резко выраженным полнокровием внутренних органов и слизистых оболочек, альве-олярным отеком легких, отеком головного мозга и мозговых оболочек. Время наступления гибели зависело от введенной дозы и составило 1–4 ч по-сле введения. По уровню летальности в экспери-

Таблица 1

#### Летальные эффекты (пало/всего) после внутривенного введения крысам

Доза, мг/кг	0	25	50	75	100	125	$LD_{50}$	$LD_{10}$
PLGA	0/5	–	–	–	–	–	–	–
Rb-HSA, самцы	–	0/5	0/5	2/5	2/5	4/5	$97,5 \pm 14,6$	45,8
Rb-HSA, самки	–	0/5	0/5	0/5	3/5	4/5	$98,5 \pm 15,2$	54,8
Rb-PLGA, самцы	–	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	–	–
Rb-PLGA, самки	–	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	МПД* = 100 мг/кг	–

Примечание. \* – максимально переносимая доза – в исследовании токсичности, самая высокая доза, которая не производит недопустимую токсичность.

Таблица 2

#### Летальные эффекты (пало/всего) после внутрибрюшинного введения мышам

Доза, мг/кг	0	50	100	200	400	800	$LD_{50}$	$LD_{10}$
PLGA	0/5	–	–	–	–	–	–	–
Rb-HSA, самцы	–	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	–	–
Rb-HSA, самки	–	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	–	–
Rb-PLGA, самцы	–	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	–	–
Rb-PLGA, самки	–	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	–	–

ментальных группах можно говорить о несколько большей токсичности Rb-HSA по сравнению с Rb-PLGA.

При наблюдении за животными в клетке и на открытой площадке через 1 сут после введения была отмечена повышенная агрессия у самцов крыс, получивших препарат Rb-PLGA в дозах от 50 до 100 мг/кг, выражавшаяся в агрессивном груминге, атаках, укусах, толчках, частых защитных вертикальных стойках, боксировании и толчках задними лапами. У животных выявлены множественные покусывания, раны на морде, ушах, лапах и хвостах. Агрессия наблюдалась весь период на-

блюдения (30 дней) и была разной по степени выраженности.

Согласно оценке динамики массы тела, однократное внутривенное или внутрибрюшинное введение животным исследуемых препаратов не оказало влияния на данный показатель. Масса тела животных равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения как в опытных, так и в контрольных группах; прибавка массы тела животных соответствовала физиологической норме [12].

При изучении индивидуального поведения животных после внутривенного и внутрибрюшинного введения препаратов гендерных различий зафиксировано не было. В табл. 3–6 данные представлены без разделения по полу.

Таблица 3

**Локомоторная активность крыс в установке «Открытое поле» на 30-й день после однократного внутривенного введения препаратов**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n	Количество (M±m)	
			посещенных квадратов	пристеночных стоек
Контрольная	0	10	35,8±1,2	12,3±0,8
PLGA	0	10	25,5±1,5	8,8±0,7
Rb-PLGA	25	10	25,7±4,4	11,3±1,5
	50	10	27,5±1,7	10,0±0,9
	75	10	30,0±3,4	13,8±1,7
	100	10	30,4±1,9	16,3±2,2*
	125	9	39,1±7,1	15,1±1,2*

Примечание. Здесь и в табл.5: \* – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой (ANOVA, тест Тьюки, p<0,05). Данные соответствовали закону нормального распределения.

Установлено, что однократное внутривенное введение препарата Rb-HSA не оказало влияния на локомоторную активность самцов и самок крыс (данные не приводятся). После введения препарата Rb-PLGA зафиксировано дозозависимое повышение локомоторной активности самцов и самок животных в сравнении с контрольной группой, получившей физиологический раствор (см. табл. 3, 4).

В отличие от препарата Rb-HSA, частицы которого

Таблица 4

**Локомоторная активность крыс в установке «Открытое поле» на 30-й день после однократного внутривенного введения препаратов Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n	Количество				
			центровых посещений	моче-испусканий	дефекаций	актов груминга	свободных стоек
Контрольная	0	10	0,0 (0,0; 1,0)	0,5 (0; 1,0)	1,0 (1,0; 2,0)	0,5 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)
PLGA	0	10	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	2,0 (1,0; 3,0)	0,5 (0,0; 2,0)
Rb-PLGA	25	10	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	50	10	0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0; 0,0)	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	75	10	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0; 0,0)	2,0 (1,0;3,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,5 (0,0;5,0)*
	100	10	0,5 (0,0;1,0)	0,0 (0;0,0)*	1,5 (1,0;3,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (0,0;3,0)*
	125	9	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0;1,0)	0,0 (0,0;1,0)	1,0 (0,0;2,0)	2,0 (1,0;2,0)*

Примечание. Здесь и в табл.6:\* – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой (критерий Краскела-Уоллиса, p<0,05). Данные не соответствовали закону нормального распределения.

быстро растворяются при введении в кровоток, Rb-PLGA представляет собой коллоидную суспензию, размер частиц которой не меняется при разбавлении. Поведенческие реакции, наблюдающиеся у крыс, получивших высокие дозы Rb-PLGA, могут быть связаны с высвобождением гистамина в результате введения значительной дозы коллоидной суспензии. Этот феномен, обусловленный активацией комплемента в ответ на внутривенное введение коллоидов (так называемая псевдоаллергическая реакция), наблюдается при введении коллоидных плазмозаменителей и липосом [13, 14]. Высвобождение гистамина в свою очередь влияет на уровень возбудимости корковых нейронов и поведенческую активность [15]. Это предположение подтверждают и данные о том, что сам РБ, обладаю-

щей способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, в высоких дозах (200 мг/кг

Таблица 5

**Локомоторная активность мышей в установке «Открытое поле» на 30-й день после однократного внутрибрюшинного введения препаратов (M±m)**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n	Количество (M±m)		
			посещенных квадратов	пристеночных стоек	заглядываний в норки
Контрольная	0	10	33,2±2,6	12,7±2,1	36,9±3,0
PLGA	0	10	32,8±2,1	15,7±1,7	34,0±4,2
Rb-HSA	50	10	27,1±2,6	3,6±0,8*	22,1±2,8*
	100	10	30,8±2,1	5,3±1,2*	31,4±2,8
	200	10	30,3±2,5	3,5±0,6*	28,0±2,5
	400	10	34,6±2,4	4,2±1,3*	19,2±1,4*
	800	10	28,9±2,8	4,7±1,0*	16,8±2,1*
Rb-PLGA	50	10	22,2±1,0*	1,5±0,5*	19,9±1,4*
	100	10	18,6±2,1*	4,1±1,1*	13,3±1,5*
	200	10	17,8±3,3*	8,4±1,3	17,6±1,9*
	400	10	20,1±2,2*	9,0±1,3	19,3±2,2*
	800	10	21,0±1,8*	3,3±0,7*	16,5±2,1*

Примечание. Данные соответствовали закону нормального распределения.

Таблица 6

**Локомоторная активность мышей в установке «Открытое поле» на 30-й день после однократного внутрибрюшинного введения препаратов Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n	Количество				
			центровых посещений	моче-испусканий	дефекаций	актов груминга	свободных стоек
Контрольная	0	10	2,5 (1,0; 4,0)	1,0 (1,0; 1,0)	2,0 (1,0; 3,0)	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)
PLGA	0	10	3,0 (1,0; 6,0)	1,0 (1,0; 1,0)	1,5 (1,0; 3,0)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 2,0)
Rb-HSA	50	10	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 2,0)
	100	10	2,0 (1,0; 3,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 1,0)*	1,0 (0,0; 3,0)	1,0 (0,0; 2,0)
	200	10	1,5 (1,0; 3,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	0,5 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 2,0)
	400	10	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	0,5 (0,0; 1,0)*	0,5 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)
	800	10	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)*	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Rb-PLGA	50	10	2,0 (1,0; 3,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)
	100	10	0,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	1,0 (1,0; 2,0)	2,0 (1,0; 4,0)	0,0 (0,0; 0,0)
	200	10	1,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,0)	1,5 (0,0; 3,0)
	400	10	3,0 (1,0; 4,0)	0,5 (0,0; 1,0)	0,5 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)*	0,0 (0,0; 1,0)
	800	10	1,0 (0,0; 1,0)*	0,0 (0,0; 0,0)*	1,0 (0,0; 2,0)	0,5 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)

Примечание. Данные соответствовали закону нормального распределения.

у мышей и 100 мг/кг крыс *per os*) оказывает не стимулирующее, а угнетающее действие на центральную нервную систему (ЦНС) [16]. С другой стороны, наночастицы PLGA практически не проникают в мозг без специальной модификации поверхности [17], следовательно, их влияние на ЦНС в данном эксперименте можно исключить.

Описанный выше феномен наблюдался только при внутрисосудистом введении коллоидных препаратов. Однократное внутрибрюшинное введение препаратов Rb-HSA и Rb-PLGA мышам оказало негативное дозозависимое влияние на локомоторную активность и эмоциональный статус экспериментальных животных, что выразилось в снижении локомоторной активности и уменьшении числа вегетативных актов (см. табл. 5, 6).

При вскрытии животных через 30 дней после однократного введения препаратов было выявлено токсическое влияние препаратов на печень и легкие, макроскопическая картина остальных внутренних органов не отличалась от таковой в контрольной группе. Печень животных, которым вводили тестируемые лекарственные формы, была несколько увеличена по сравнению с контрольными животными, имела гладкую и блестящую поверхность. На разрезе наблюдалась ткань

обычного кровенаполнения, коричневого цвета, неоднородная, с нечетким рисунком долек. В легких животных, получивших препараты, наблюдали полнокровие.

При оценке массовых коэффициентов внутренних органов было выявлено влияние различных лекарственных форм РБ на массовые показатели печени и легких (табл. 7, 8). Статистически значимых изменений коэффициентов других органов не обнаружено.

Внутривенное введение препарата Rb-HSA крысам привело к умеренному дозозависимому увеличению массовых коэффициентов печени, тогда как внутрибрюшинное введение мышам этой же лекарственной формы способствовало увеличению массовых коэффициентов печени и легких у самцов и уменьшению массовых коэффициентов легких у самок. Препарат Rb-PLGA при внутривенном введении вызвал увеличение массовых коэффициентов печени у самок крыс. Внутрибрюшинное введение препарата приводило к увеличению массовых коэффициентов печени и легких у мышей-самцов и уменьшению массовых коэффициентов печени и легких у мышей-самок.

Выявленные изменения указывают на тропность новых лекарственных форм РБ к печени и легким, что определяет их фармакологические и токсические эффекты.

В исследованных гистологических препаратах печени животных отмечены признаки паренхиматозной дистрофии: гепатоциты в состоянии мелкозернистой дистрофии. После внутривенного введения крысам Rb-HSA в дозах от 75 до 125 мг/кг и Rb-PLGA в дозах от 100 и 125 мг/кг, а также после внутрибрюшинного введения мышам-самцам Rb-HSA и Rb-PLGA в дозе 800 мг/кг определялись мелкокапельное ожирение

Таблица 7

**Влияние однократного внутривенного введения препаратов Rb-HSA и Rb-PLGA на массовые коэффициенты внутренних органов крыс (M±m)**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n, самцы/ самки	Печень		Легкие с трахеей	
			самцы	самки	самцы	самки
Контрольная	0	5/5	4,60±0,16	4,0±0,18	0,96±0,12	0,84±0,03
PLGA	0	5/5	4,6±0,25	4,5±0,29	0,92±0,15	0,86±0,03
Rb-HAS	25	5/5	5,40±0,07*	4,90±0,12*	0,90±0,05	0,90±0,02
	50	5/5	5,50±0,10*	5,40±0,06*	0,74±0,04	0,79±0,03
	75	3/5	5,30±0,34	5,50±0,17*	0,80±0,07	0,81±0,04
	100	3/2	5,10±0,20	4,98; 5,15	0,80±0,09	0,79; 0,74
	125	1/1	6,04	5,10	0,90	0,83
Rb-PLGA	25	5/5	4,00±0,21	4,80±0,14	0,96±0,07	0,83±0,02
	50	5/5	4,50±0,09	5,10±0,33*	0,76±0,01	0,92±0,06
	75	5/5	4,90±0,10	5,10±0,23*	0,85±0,06	0,92±0,06
	100	5/5	5,30±0,30	5,10±0,25*	0,87±0,12	0,76±0,06
	125	5/4	5,10±0,08	5,20±0,18*	0,73±0,02	0,82±0,06

Примечание. Здесь и в табл. 8: \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольными животными (ANOVA, тест Тьюки, p<0,05).

Таблица 8

**Влияние однократного внутрибрюшинного введения препаратов Rb-HSA и Rb-PLGA на массовые коэффициенты внутренних органов мышей ( $M \pm m$ )**

Препарат/ группа	Доза, мг/кг	n, самцы/ самки	Печень		Легкие с трахеей	
			самцы	самки	самцы	самки
Контрольная	0	5/5	6,50±0,26	7,00±0,45	0,96±0,04	1,50±0,04
PLGA	0	5/5	7,0±0,35	6,3±0,29	1,05±0,03	1,09±0,08*
Rb-HSA	50	5/5	7,50±0,19	5,80±0,24	0,86±0,09	0,98±0,08*
	100	5/5	7,20±0,30	6,20±0,19	1,12±0,11	1,04±0,03*
	200	5/5	6,70±0,33	6,50±0,21	1,07±0,10	1,00±0,07*
	400	5/5	6,90±0,32	7,10±0,19	0,96±0,08	1,13±0,10*
	800	5/5	7,90±0,49*	7,40±0,37	0,94±0,06	0,79±0,04*
Rb-PLGA	50	5/5	8,10±0,28*	7,90±0,44	0,95±0,06	0,85±0,04*
	100	5/5	7,30±0,27	5,30±0,18*	1,39±0,10*	0,88±0,07*
	200	5/5	6,80±0,30	6,20±0,29	1,30±0,16	1,00±0,09*
	400	5/5	7,10±0,33	6,20±0,27	1,47±0,07*	1,17±0,05
	800	5/5	7,30±0,23	5,40±0,43	0,82±0,07	0,94±0,08*

гепатоцитов, расширение портальных трактов с умеренной моноклеарной инфильтрацией в сочетании со слабой межуточной инфильтрацией. В группах животных, получивших исследуемые препараты, выявлена гиперплазия парабронхиальной лимфоидной ткани: в области корня легкого лимфоидная ткань занимала большую площадь по сравнению с таковой в контрольной группе и группах плацебо, определялись единичные лимфоидные фолликулы, увеличенные в размере, с герминативным центром, дифференцируемой мантийной зоной. Морфологические изменения коррелировали с дозой препарата: при снижении дозы препаратов РБ морфологическая картина становилась менее выражена и встречалась у меньшего числа особей. Следует отметить, что изменения после внутрибрюшинного введения были более выражены у мышья-самцов и встречались в 2 раза чаще, чем у самок. Также отмечали полнокровие ткани легких. Выявленные изменения свидетельствуют о том, что новые лекарственные формы РБ хорошо проникают в печень и легкие.

**Заключение**

По показателям значений летальных доз форма Rb-HSA несколько более токсична по сравнению с формой Rb-PLGA. Однако, согласно результатам комплексного изучения параметров острой токсичности, препараты наноразмерных лекарственных форм РБ являются эквитоксичными. Основные органы-мишени токсического действия препаратов – ЦНС, печень и легкие. При сравнении значений ЛД<sub>50</sub> при внутривенном введении наноразмерных лекарственных форм РБ с данными литературы о его среднелетальной дозе [6, 11, 16], можно сделать вывод о меньшей токсичности новых лекарственных форм РБ.

**Благодарность**

Исследование было выполнено при поддержке Федеральной целевой программы «Фарма-2020» и ООО «НППК «Наносистема».

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Литература**

1. Цыбанев А.А., Соколова Г.Б. Противотуберкулезный антибиотик пролонгированного действия рифабутин. Антимикробный спектр, особенности фармакодинамики и фармакокинетики. Антибиотики и химиотерапия. 1999; 8: 30–6.
2. Blaschke TF, Skinner MH. The clinical pharmacokinetics of rifabutin. Clin Infect Dis. 1996 Apr;22 Suppl 1: 15–22.
3. Туберкулез и ВИЧ-инфекция: тактика ведения пациентов с сочетанной инфекцией. Клинический протокол для Европейского региона ВОЗ. Электронный ресурс: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0003/78132/Chap\\_4\\_TB\\_4\\_web\\_rus.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/78132/Chap_4_TB_4_web_rus.pdf).
4. Rifabutin. Tuberculosis, 2008, 88(2) 145–7.
5. Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012; 48.
6. MSDS и ЛД50 рифабутин. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://www.pfizer.com/files/products/material\\_safety\\_data/RIFABUTIN%20CAPSULES](http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/RIFABUTIN%20CAPSULES)



7. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В. и др. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным. *Международный вестник ветеринарии*, 2013; 3: 78–84.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012.
9. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*, 2003; 37 (3): 32–4.
10. Измеров Н.Ф., Саночкин И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии. *Справочник*. М.: Медицина, 1977; 240.
11. Brughera M, Scampini G, Newman AJ, Castellino S, Sammartini U, Mazué G. Overview of toxicological data on rifabutin. *Exp Toxicol Pathol*. 1995; 47 (1):1–9.
12. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Под ред. В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. *Справочник*. СПб.: ЛЕМА, 2013; 116.
13. Ring J, Laubenthal H, Messmer K. Incidence and classification of adverse reactions to plasma substitutes. *Klin Wochenschr*. 1982; 60 (17): 997–1002.
14. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*. 2003; 14 (9): 1430–7.
15. M. B. Passani, P. Panula, J.-Sh. Lin. Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*. 2014; 8: 64.
16. MYCOBUTIN\* (rifabutin capsules USP), PRODUCT MONOGRAPH, Pfizer Canada Inc., 2015. [https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN\\_PM\\_E.pdf](https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN_PM_E.pdf).
17. J. Li and C. Sabliov. PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Nanotechnol Rev* 2013; 2 (3): 241–57.
3. Tuberculosis and HIV infection: tactics of managing patients with co-infection. Clinical protocol for the WHO European Region. Electronic resource: [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0003/78132/Chap\\_4\\_TB\\_4\\_web\\_rus.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/78132/Chap_4_TB_4_web_rus.pdf) (in Russian).
4. Rifabutin. *Tuberculosis*, 2008, 88 (2): 145–7.
5. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. *Sankt-Peterburg*, 2012; 48 (in Russian).
6. MSDS and LD50 Rifabutin. [Electronic resource]. Access mode: [http://www.pfizer.com/files/products/material\\_safety\\_data/RIFABUTIN%20CAPSULES\\_Circulation\\_date\\_03.2018](http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/RIFABUTIN%20CAPSULES_Circulation_date_03.2018) (in Russian).
7. Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanatiev G.V. et al. Possible ways and volumes of administration of medicines to laboratory animals. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii*, 2013; 3: 78–84 (in Russian).
8. Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products. Part one. Moscow: Grif i K; 2012 (in Russian).
9. Berezovskaya I.V. Classification of chemicals by acute toxicity parameters for parenteral administration. *Chemico-Pharmaceutichesky Journal*, 2003; 37 (3): 32–4 (in Russian).
10. Izmerov N.F., Sanotsky I.V., Sidorov K.K. Parameters of toxicometry of industrial poisons with a single exposure. *Directory*. Moscow: Medicina, 1977; 240 (in Russian).
11. Brughera M, Scampini G, Newman AJ, Castellino S, Sammartini U, Mazué G. Overview of toxicological data on rifabutin. *Exp Toxicol Pathol*. 1995; 47 (1): 1–9.
12. Physiological, biochemical and biometric indices of the norm of experimental animals. *Directory*. (ed. by V.G. Makarov, M.N. Makarova). *Sankt-Peterburg, «LEMA»*; 2013: 116 (in Russian).
13. Ring J, Laubenthal H, Messmer K. Incidence and classification of adverse reactions to plasma substitutes. *Klin Wochenschr*. 1982; 60 (17): 997–1002.
14. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*. 2003; 14 (9): 1430–7.
15. M. B. Passani, P. Panula, J.-Sh. Lin. Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*. 2014; 8: 64.
16. MYCOBUTIN\* (rifabutin capsules USP), PRODUCT MONOGRAPH, Pfizer Canada Inc., 2015. [https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN\\_PM\\_E.pdf](https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN_PM_E.pdf).
17. J. Li and C. Sabliov. PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Nanotechnol Rev* 2013; 2(3): 241–57.

Поступила 30 марта 2018 г.

## References

1. Tsybanev AA, Sokolova G.B. Anti-tuberculosis antibiotic with prolonged action rifabutin. Antimicrobial spectrum, features of pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Antibiotici i chimioterapiya*, 1999; 8: 30–6 (in Russian).
2. Blaschke TF, Skinner MH. The clinical pharmacokinetics of rifabutin. *Clin. Infect. Dis*. 1996 Apr; 22 Suppl 1: 15–22.
3. Tuberculosis and HIV infection: tactics of managing patients with co-infection. Clinical protocol for the WHO European Region. Electronic resource: [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0003/78132/Chap\\_4\\_TB\\_4\\_web\\_rus.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/78132/Chap_4_TB_4_web_rus.pdf) (in Russian).
4. Rifabutin. *Tuberculosis*, 2008, 88 (2): 145–7.
5. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. *Sankt-Peterburg*, 2012; 48 (in Russian).
6. MSDS and LD50 Rifabutin. [Electronic resource]. Access mode: [http://www.pfizer.com/files/products/material\\_safety\\_data/RIFABUTIN%20CAPSULES\\_Circulation\\_date\\_03.2018](http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/RIFABUTIN%20CAPSULES_Circulation_date_03.2018) (in Russian).
7. Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanatiev G.V. et al. Possible ways and volumes of administration of medicines to laboratory animals. *Mezhdunarodny vestnik veterinarii*, 2013; 3: 78–84 (in Russian).
8. Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products. Part one. Moscow: Grif i K; 2012 (in Russian).
9. Berezovskaya I.V. Classification of chemicals by acute toxicity parameters for parenteral administration. *Chemico-Pharmaceutichesky Journal*, 2003; 37 (3): 32–4 (in Russian).
10. Izmerov N.F., Sanotsky I.V., Sidorov K.K. Parameters of toxicometry of industrial poisons with a single exposure. *Directory*. Moscow: Medicina, 1977; 240 (in Russian).
11. Brughera M, Scampini G, Newman AJ, Castellino S, Sammartini U, Mazué G. Overview of toxicological data on rifabutin. *Exp Toxicol Pathol*. 1995; 47 (1): 1–9.
12. Physiological, biochemical and biometric indices of the norm of experimental animals. *Directory*. (ed. by V.G. Makarov, M.N. Makarova). *Sankt-Peterburg, «LEMA»*; 2013: 116 (in Russian).
13. Ring J, Laubenthal H, Messmer K. Incidence and classification of adverse reactions to plasma substitutes. *Klin Wochenschr*. 1982; 60 (17): 997–1002.
14. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*. 2003; 14 (9): 1430–7.
15. M. B. Passani, P. Panula, J.-Sh. Lin. Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*. 2014; 8: 64.
16. MYCOBUTIN\* (rifabutin capsules USP), PRODUCT MONOGRAPH, Pfizer Canada Inc., 2015. [https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN\\_PM\\_E.pdf](https://www.pfizer.ca/sites/g/files/g10037206/f/201710/MYCOBUTIN_PM_E.pdf).
17. J. Li and C. Sabliov. PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Nanotechnol Rev* 2013; 2(3): 241–57.