

Экспериментальное исследование биодоступности комбинированного препарата Диоксазид

Логунова И. В., Богомолова Н. С., Чистяков В. В.

Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва

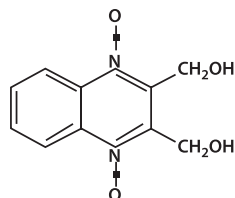
Резюме

На беспородных крысах-самцах изучена биодоступность комбинированного препарата Диоксазида (лиофилизированный порошок, содержащий 100 мг диоксилина и 250 мг изониазида) после внутрибрюшинного введения дозы 25 мг/кг по диоксилину и 62,5 мг/кг по изониазиду. В качестве сравнения использовали индивидуальные введения субстанции диоксилина и изониазида в дозах, соответственно, 25 и 62,5 мг/кг. МЕТОД: Концентрацию препаратов в сыворотке крови определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при 260 нм. РЕЗУЛЬТАТЫ: комбинированное введение изониазида не влияет на биодоступность диоксилина. Вместе с тем, наблюдается снижение концентрации изониазида в крови и увеличение содержания в печени в сравнении с индивидуальным внутрибрюшинным введением препарата в эквимольных дозах.

Ключевые слова: биодоступность, Диоксазид, диоксилин, изониазид, туберкулез, внутрикавернозное выделение.

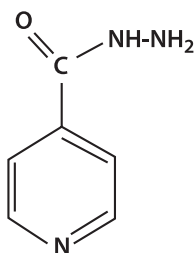
Диоксазид — комбинированный препарат (лиофилизированная лекарственная форма), состоящий из 100 мг диоксилина и 250 мг изониазида, предназначен для лечения туберкулёза при внутрикавернозном введении.

Диоксилин — 1,4-Ди-N-окись 2,3-бис- (оксиметил) хиноксалина.



Подобно хиноксалину, является антибактериальным препаратом широкого спектра действия. Эффективен при инфекциях, вызванных синегнойной палочкой, палочкой дизентерии, сальмонеллами, стафилококками, стрептококками. Действует на штаммы бактерий, устойчивые к другим химиотерапевтическим препаратам, включая антибиотики [1].

Изониазид — гидразид изоникотиновой кислоты — является основным представителем производных изоникотиновой кислоты, нашедших применение в качестве противотуберкулёзных средств.



Обладает высокой бактериостатической активностью в отношении микобактерий туберкулёза. Препарат хорошо всасывается из ЖКТ. Максимальная концентрация в крови достигается через 1–4 ч после приёма внутрь; в течение 6–24 ч после приёма разовой дозы он находится в крови в бактериостатической концентрации [2]. Применяют изониазид для лечения всех форм и локализаций активного туберкулёза у взрослых и детей.

В Центре химии лекарственных средств «ВНИХФИ» совместно с ООО «Фермент» разработана лекарственная форма комбинации диоксилина и изониазида в виде лиофилизированного порошка, получившая название Диоксазид для лечения туберкулёза. Комбинация диоксилина и изониазида в опытах *in vitro* показала увеличение бактериостатической активности в отношении микобактерий туберкулёза, по сравнению с отдельным применением изониазида [3].

В настоящей работе решалась задача исследования биодоступности диоксилина и изониазида, применяемых отдельно и в комбинации в виде лекарственной формы Диоксазида (по 0,1 г субстанции диоксилина и 0,25 г изониазида) на животных после внутрибрюшинного введения.

Экспериментальная часть

Животные. Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах массой тела 160–180 г, полученных из питомника РАМН «Столбовая», Московская обл. Животных содержали в стационарных условиях при естественном световом режиме и стандартном рационе (комбикорм, вода). За 20 ч до начала эксперимента животных лишали пищи.

Препарат. Для отдельного применения использовали субстанции диоксидина и изониазида. При комбинированном применении использовали лекарственную форму (лиофилизированный порошок, содержащий в одном флаконе 100 мг диоксидина и 250 мг изониазида), изготовленную в ООО «Фермент» (Россия).

Способ введения и дозы. Сравнимые препараты вводили однократно внутривенно в эквивалентных дозах в физиологическом растворе. Для диоксидина — 25 мг/кг, для изониазида — 62,5 мг/кг.

Отбор проб. Пробы крови после декапитации крыс в объеме 7–9 мл отбирали в стеклянные (10 мл) пробирки спустя 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 минут после введения препаратов. После центрифугирования при 3 тыс. об/мин отбирали 3 мл сыворотки, замораживали и хранили до анализа при температуре -20°C .

Пробы печени (0,5 г) после декапитации крыс отбирали спустя 30, 60, 120 минут после введения, замораживали и хранили до анализа при температуре -20°C .

ВЭЖХ-условия. Для определения диоксидина и изониазида в сыворотке крови крыс разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющий в одних хроматографических условиях фиксировать оба препарата.

Хроматографическая система «Waters». Колонка «Диасорб-130-C16 Т», 7 мкм (250×4,6 мм). Элюент — 15% метанола; 85% воды, доведенной до pH=8,5 бутиламином и подкисленной фосфорной кислотой до pH=6,8. Скорость потока элюента — 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы (инжектор «Rheodyne») — 20 мкл. УФ-детектор при длине волны 260 нм. Время удерживания диоксидина — 7,6 мин, изониазида — 6,2 мин.

Извлечение. К 100 мкл плазмы крови прибавляли 200 мкл охлажденного метанола, перемешивали на приборе «Thermolyne Maxi Mix» (SYBRON).

После центрифугирования при 14 тыс. об/мин 20 мкл надосадочной жидкости анализировали методом ВЭЖХ. Предел обнаружения диоксидина в сыворотке крови — 0,1 мкг/мл, изониазида — 0,5 мкг/мл.

Для извлечения изониазида из печени к водному гомогенату (1 мл) прибавляли 300 мкл изопропанола, экстрагировали препарат 3 мл хлороформа при активном встряхивании. После центрифугирования органический слой отделяли и упаривали досуха под током азота. Остаток растворяли при встряхивании в 200 мкл элюента, 50 мкл вводили в хроматографическую колонку. Извлечение изониазида из печени составило 80%; предел обнаружения — 0,5 мкг/0,5 г.

Концентрацию препаратов в сыворотке крови крыс рассчитывали методом абсолютной калибровки с использованием интегрирующей хроматографической системы «МультиХром» «Амперсенд». Калибровочные кривые диоксидина и изониазида линейны в диапазоне 0,5–50 мкг/мл плазмы крови, 0,5–10 мкг/0,5 г печени. Полученные калибровочные графики (мкг/100 мкл плазмы, мкг/0,5 г печени) описываются линейным уравнением вида $Y = aX + b$, где:

для диоксидина $a = 0,003$; $b = 0,15$; $r = 0,996$

для изониазида $a = 0,017$; $b = -0,077$; $r = 0,992$

для изониазида (печень) $a = 0,224$; $b = -0,257$; $r = 0,998$

На рис. 1 представлены типичные хроматограммы контрольной сыворотки, сыворотки крови, содержащей диоксидин и изониазид и хроматограмма пробы сыворотки крови после введения комбинации препаратов.

Фармакокинетические параметры рассчитывали модельно-независимым методом (программа «M-IND»), статистическая обработка данных проведена с использованием «Origin 6.0», «SigmaPlot», графика — «SigmaPlot».

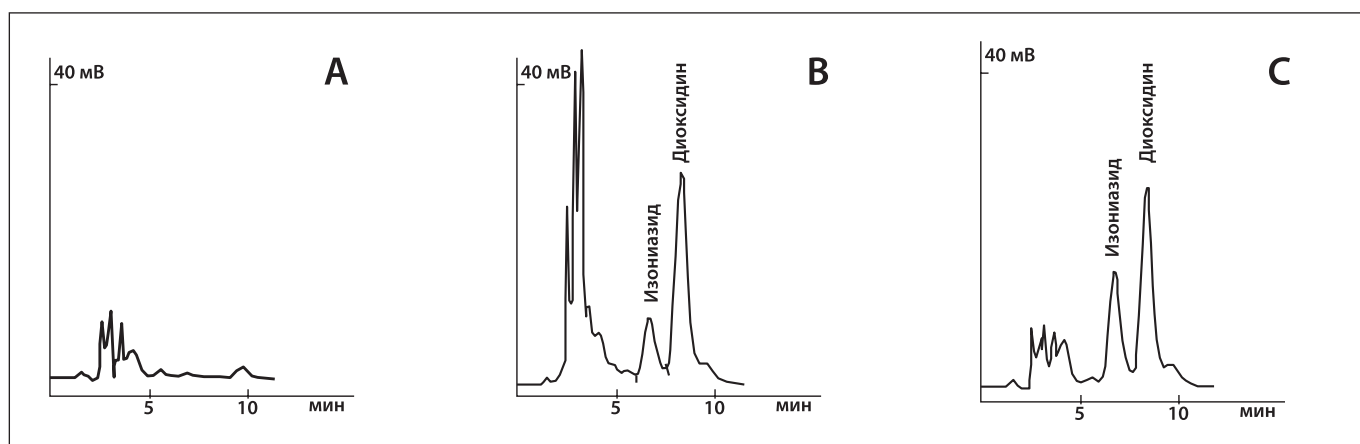


Рис. 1. Типичные хроматограммы: (А) контрольной сыворотки крови; (В) 100 мкл сыворотки крови, содержащие 3 мкг диоксидина и 7,5 мкг изониазида; (С) пробы сыворотки крови через 30 мин после комбинированного введения препаратов.

Ось абсцисс — время, мин; ось ординат — отклик детектора, мВ

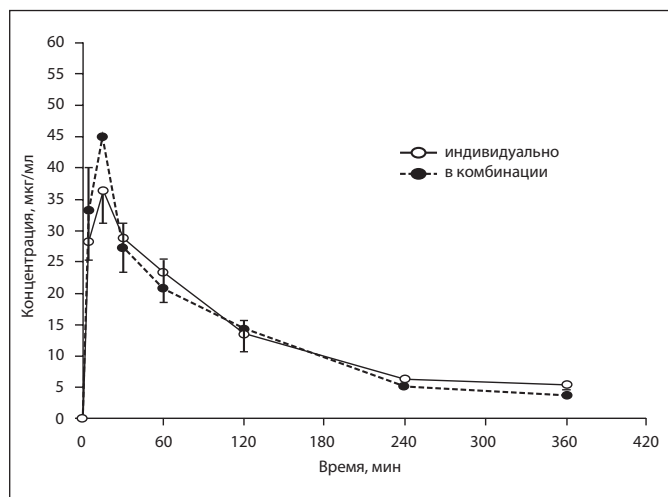


Рис. 2. Содержание диоксидина в сыворотке крови крыс после отдельного внутрибрюшинного введения и в комбинации с изониазидом в дозе 25 мг/кг. Приведены средние значения с 95% доверительным интервалом, n=6

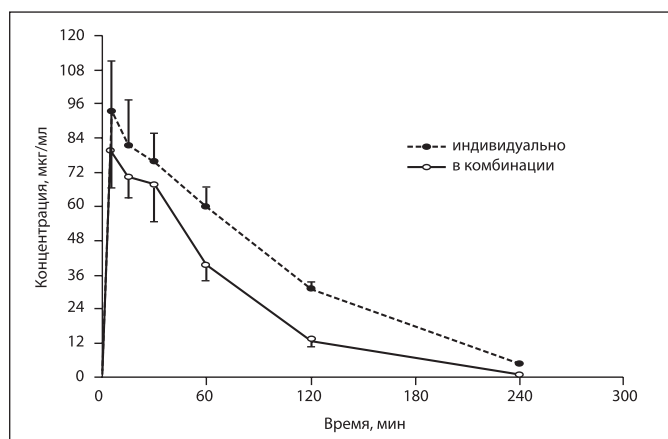


Рис. 3. Содержание изониазида в сыворотке крови крыс после отдельного внутрибрюшинного введения и в комбинации с диоксицином в дозе 62,5 мг/кг. Приведены средние значения с 95% доверительным интервалом, n=6

Результаты и обсуждение

С целью оценки биологической доступности исследуемых лекарственных форм были определены концентрации диоксидина и изониазида

в сыворотке крови крыс при отдельном и комбинированном применении препаратов, рассчитаны основные фармакокинетические параметры, позволяющие количественно охарактеризовать относительную степень всасывания действующего вещества (f'), величины площадей под фармакокинетическими кривыми зависимости «концентрация-время» (AUC_{0-360}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}) и значения максимальных концентраций (C_{max}). Оценку параметра (f') — относительной степени всасывания — рассчитывали как отношение площадей AUC_{0-360} под фармакокинетическими кривыми при отдельном и комбинированном применении препаратов.

На рис. 2 и 3 представлены фармакокинетические профили содержания диоксидина и изониазида при индивидуальном введении и в комбинации.

В табл. 1 и 2 приведены рассчитанные по концентрационным кривым основные фармакокинетические параметры C_{max} , T_{max} , MRT (среднее время удержания), AUC (площадь под фармакокинетической кривой), CL (клиренс) и V_z (объем распределения) для диоксидина и изониазида.

С целью оценки относительной биодоступности диоксидина и изониазида сравнивали значения максимальной концентрации (C_{max}), времени её достижения (T_{max}), площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-360}), полученные при отдельном введении препаратов и в комбинации.

Диоксидин. Из приведённого рис. 2 видно, что профиль концентрации диоксидина при индивидуальном введении повторяет профиль концентрации при комбинации с изониазидом. Максимальные концентрации регистрируются спустя 15 мин после внутрибрюшинного введения в эквивалентных дозах 25 мг/кг и составляют при отдельном применении $44,6 \pm 6,9$ мкг/мл, при комбинации — $36,3 \pm 5,2$ мкг/мл. Незначительное увеличение степени всасывания (AUC), рассчитанное как отношение площадей под фармакокинетической кривой «концентрация-время», для комбинированного и индивидуального введения составило всего 5%:

Таблица 1

Фармакокинетические параметры диоксидина

| Применение препарата | C_{max} , мкг/мл | T_{max} , мин | MRT, мин | AUC_{0-360} , мкг/мл/мин | CL, мл/мин | V_z , мл |
|----------------------|--------------------|-----------------|----------|----------------------------|------------|------------|
| индивидуальное | $44,6 (\pm 6,9)$ | 15 | 153,0 | 4456,0 | 0,7 | 132 |
| в комбинации | $36,3 (\pm 5,2)$ | 15 | 219,2 | 4698,0 | 0,6 | 165 |

Таблица 2

Фармакокинетические параметры изониазида

| Применение препарата | C_{max} , мкг/мл | T_{max} , мин | MRT, мин | AUC_{0-360} , мкг/мл/мин | CL, мл/мин | V_z , мл |
|----------------------|--------------------|-----------------|----------|----------------------------|------------|------------|
| индивидуальное | $93,0 (\pm 18,6)$ | 5 | 75,1 | 9114,0 | 1,1 | 60 |
| в комбинации | $79,6 (\pm 13,2)$ | 5 | 55,1 | 5955,2 | 1,6 | 70 |

Концентрации изониазида в печени при отдельном введении субстанции и в комбинации с диоксидином, в дозе 62,5 мг/кг (n=5)

| Показатели | Время отбора проб, мин | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------|---------|----------------------------|--------|---------|
| | индивидуальное применение | | | в комбинации с диоксидином | | |
| | 30 мин | 60 мин | 120 мин | 30 мин | 60 мин | 120 мин |
| среднее значение, мкг/г | 19,6 | 10,6 | 3,2 | 49,7 | 44,0 | 16,0 |
| стандартная ошибка | 1,4 | 1,0 | 0,2 | 4,7 | 3,5 | 0,9 |
| доверительный интервал (95 %) | 3,1 | 2,2 | 0,5 | 10,1 | 7,6 | 2,0 |

$$F = \text{AUC}_{\text{комбинация}} / \text{AUC}_{\text{отдельно}} = 1,05$$

Таким образом, проведенные исследования показали, что изониазид не влияет на биодоступность диоксидина.

Изониазид. Из кинетической кривой, представленной на рис. 3, видно, что при комбинированном применении наблюдаются достоверные различия в концентрациях препарата, начиная с 60 минут, по сравнению с индивидуальным введением. Абсорбция в кровь в обоих случаях чрезвычайно быстрая. Уже через 5 мин после внутрибрюшинного введения фиксируются максимальные концентрации изониазида, которые при отдельном применении составляют $93,0 \pm 18,6$ мкг/мл, при комбинированном — $79,6 \pm 13,2$ мкг/мл.

Относительная биодоступность изониазида, рассчитанная как отношение площадей под фармакокинетической кривой «концентрация-время», для комбинации и индивидуального введения составила:

$$F = \text{AUC}_{\text{комбинация}} / \text{AUC}_{\text{отдельно}} * 100 = 65,3\%$$

Такое снижение биодоступности изониазида при комбинированном применении с диоксидином может быть объяснено нижеследующими положениями.

Диоксидин может выступать в роли индуктора метаболизма изониазида. Хорошо известно, что изониазид в живом организме активно подвергается процессу ацилирования N-ацетилтрансферазой [4]. Увеличение активности этого фермента приводит к снижению концентрации исходного изониазида.

Вместе с тем, наблюдаемое нами снижение концентрации в крови может происходить за счёт более быстрого и полного распределения изониазида по органам и тканям, т.е. диоксидин возможно способствует более быстрому и полному проникновению изониазида в периферические ткани, что и объясняет повышение бактериоста-

тической активности в отношении микобактерий туберкулёза. Повышение значения V_z (объёма распределения) в случае комбинированного применения также является косвенным показателем улучшения проникновения в ткани. Аналогичную картину уже наблюдали на крысах при комбинации изониазида с антибиотиком рифампицином [5].

Проведённые нами исследования содержания изониазида в печени крыс показали, что количество изониазида в этом органе при применении препарата в комбинации с диоксидином возрастало, по сравнению с данными, полученными при индивидуальном применении (табл. 3).

Уже через 30 минут концентрация изониазида в печени при комбинированном введении в 2,5 раза превышает таковую при индивидуальном применении.

Таким образом, после комбинированного введения диоксидина и изониазида наблюдается снижение концентрации изониазида в сыворотке крови и достоверное увеличение содержания в органах (в частности, в печени) по сравнению с индивидуальным применением.

Выводы

Проведённое на крысах исследование биодоступности лекарственной формы диоксазида (лиофилизированный порошок, содержащий в одном флаконе 100 мг диоксидина и 250 мг изониазида) показало:

- 1) при комбинированном применении изониазид не влияет на биодоступность диоксидина. Концентрации диоксидина в изученном временном интервале практически одинаковы.
- 2) При комбинированном применении происходит снижение концентрации изониазида в крови и увеличение содержания в печени, в сравнении с индивидуальным внутрибрюшинным введением препарата в эквивалентных дозах.

Литература

1. Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России. 2002. Вып. 9. С. 305.
2. Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России. 2002. Вып.9. С. 349.
3. Глушков Р.Г., Соколова Г.Б., Крылова Л.Ю. и др. // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. 2007. № 3. Р. 20-25.
4. Upton A.M., Mushtaq A., Victor T.C., et al. // Mol. Microbiol. 2001. Vol. 42. № 2. Р. 309-17.
5. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Анисимова Н.Б. и др. Антибиотики и химиотерапия. 1988. Т. 33, № 10. С. 786-9.