

Оценка гипотетической токсичности комбинированных препаратов на примере двух инъекционных лекарственных форм антибиотиков

Р. Д. СЮБАЕВ¹, Г. В. ДОЛГОВА¹, Н. П. НЕУГODOVA¹, М. Н. ХАЙРЕТДИНОВА¹, П. В. ШАДРИН¹, А. А. МУКОНИН²

¹ Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России, Москва

² Смоленская государственная медицинская академия

Estimate of Hypothetical Toxicity of Drug Combinations Exemplified by Two Injection Antibiotics

R. D. SYUBAEV, G. V. DOLGOVA, N. P. NEUGODOVA, M. N. KHAIRETDINOVA, P. V. SHADRIN, A. A. MUKONIN

Scientific Centre for Investigation of Medicinal Products, Moscow
Smolensk State Medical Academy, Smolensk

В последние годы для повышения терапевтического эффекта создают комбинированные лекарственные формы, состоящие из двух или нескольких действующих веществ. После доказательства наличия большего антимикробного эффекта комбинированного препарата необходимым этапом является изучение токсичности нового комплекса. Задача такой работы заключается в определении типа взаимодействия по токсическим эффектам при объединении выбранных компонентов в одной лекарственной форме. Для этого в экспериментах на лабораторных животных устанавливается средняя смертельная доза как для каждого действующего вещества в отдельности, так и для созданной комбинированной формы. Оценку типа взаимодействия компонентов проводят с помощью специальных математических методик, способ применения которых продемонстрирован в данной статье на примере двух комбинированных антибактериальных препаратов.

Одним из препаратов является новая оригинальная лекарственная форма «Сульцефабол, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения» производства ООО «АБОЛмед» (далее по тексту «Сульцефабол»). В этой комбинированной лекарственной форме объединены антибиотик цефалоспоринового ряда — цефотаксим и ингибитор бета-лактамаз — сульбактам в соотношении 2:1.

Цефотаксим — цефалоспорин III поколения, бактерицидное действие которого связано с инаktivацией ферментов транспептидаз, участвующих в синтезе пептидогликана — основного

структурного компонента клеточной стенки бактерий [1, 2]. В данной лекарственной форме устойчивость цефотаксима к β -лактамазам усилена сульбактамом — производным основного ядра пенициллина. Сульбактам не обладает клинически значимой антибактериальной активностью, но является ингибитором основных бактериальных бета-лактамаз, включая и плазмидные, разрушающих пенициллины и цефалоспорины, и определяющих устойчивость микроорганизмов к беталактамным антибиотикам. Кроме того, сульбактам способен связывать некоторые пенициллинсвязывающие белки, что повышает концентрацию цефотаксима в периплазматическом пространстве. Поэтому комбинация сульбактама с цефотаксимом оказывает более выраженное бактерицидное действие на чувствительные к цефотаксиму штаммы и действует синергично в отношении различных микроорганизмов, прежде всего, продуцентов бета-лактамаз [3].

Другой препарат представляет собой известную комбинированную лекарственную форму двух полусинтетических пенициллинов — ампициллина и пенициллиназоустойчивого оксациллина, объединенных в соотношении 2:1, производимую ООО «АБОЛмед» (далее по тексту «Ампициллин + Оксациллин»). Этот комбинированный препарат объединяет спектр антибактериального действия ампициллина и оксациллина. Подобные комбинации антибиотиков расширяют спектр и в ряде случаев усиливают (за счёт возможного синергизма) действие каждого компонента в отдельности, уменьшают риск селекции устойчивых форм микроорганизмов и находят применение в случаях невыявленного бактериологического диагноза, а также при смешанных инфекциях. Механизм действия готовой лекарственной формы соответствует меха-

© Коллектив авторов, 2011

Адрес для корреспонденции: 117246, Москва, Научный проезд, 14А. НЦ ЭСМП.

низму действия составляющих его компонентов и является общим для всех пенициллинов. В основном, это специфическое и избирательное подавление биосинтеза стенки микробной клетки [4].

Материал и методы

Для того чтобы охарактеризовать по токсичности тип комбинированного взаимодействия указанных веществ, необходимо получить величины их средних смертельных доз для каждого составляющего в соответствующей комбинации.

Эксперименты проводили на белых лабораторных мышах, которых получали из Филиала «Андреевка» ГУ НЦ «Биомедицинские технологии» РАМН. Животных содержали в виварии согласно санитарным правилам [5] и на стандартном рационе в соответствии с приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.83г с использованием сухого гранулированного корма производства (ООО «Лабораторкорм», Москва) [6]. Работу с животными осуществляли в соответствии с приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. [7].

Из субстанций ампициллина, оксациллина, цефотаксима и сульбактама готовили растворы на воде для инъекций так, чтобы испытуемые дозы в пересчёте на действующее вещество содержались в 0,5 мл приготовленных растворов. Комбинированные лекарственные препараты также растворяли в воде и готовили растворы с содержанием испытуемых доз в пересчёте на сумму действующих веществ в объёме 0,5 мл.

Перед опытом для стабилизации массы тела белых мышей лишали корма и воды. Через 2 ч их взвешивали, отбирали особей с массой тела 19–21 г и рандомизировали по группам.

Приготовленные растворы в объёме 0,5 мл вводили в хвостовую вену однократно со скоростью 0,1 мл/сек. Каждую из доз испытывали на 10 животных (5 самцов, 5 самок). Срок наблюдения составлял 48 ч, на протяжении которого учитывали число погибших животных.

По результатам экспериментов рассчитывали величины средних смертельных доз (LD_{50}) субстанций и комбинированных препаратов с доверительным интервалом для уровня вероятности 0,95. Расчёты выполняли пробит-методом (метод максимального правдоподобия) [8].

Для оценки характера взаимодействия субстанций амициллина и оксациллина, а также сульбактама и цефотаксима, объединённых в лекарственных формах «Ампициллин + Оксациллин» и «Сульцефабол» соответственно был использован графический метод построения изобол — комбинационный квадрат (Loewe) [9], а также вычислительный метод [10].

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в экспериментах, и данные расчётов LD_{50} представлены в таблицах 1–4.

Полученные расчётные показатели токсичности субстанций цефотаксима и сульбактама (LD_{50}) были использованы для изучения характера их токсического взаимодействия (коергизма) в комбинированной лекарственной форме «Сульцефабол» с помощью графического метода построения изобол — комбинационного квадрата (Loewe) [9].

Величины LD_{50} цефотаксима и сульбактама были приняты за 100% и нанесены на оси двухмерной системы координат — абсцисс и ординат соответственно, а затем полученные точки соединены прямой (прямая аддитивного взаимодействия).

Цефотаксим и сульбактам в исследуемом лекарственном препарате «Сульцефабол» объединены в соотношении 2:1, поэтому доли этих субстанций в LD_{50} комбинированного препарата составили в весовых единицах для цефотаксима, 68,7 мг/мышь (2 части), а для сульбактама — 34,4 мг/мышь (1 часть). Указанные величины в процентном отношении от индивидуального значения LD_{50} для каждой из субстанций равнялись: для цефотаксима — 43,5%, а для сульбактама — 50,7%. Рассчитанные точки также были нанесены

Таблица 1. Показатели острой токсичности субстанций «Сульбактам» и «Цефотаксим» в опытах на белых мышах

Препарат	Доза, в/в (в мг действующего вещества на мышь)	Частота* гибели мышей после введения	Расчётные показатели, мг/мышь
Сульбактам (субстанция)	50	0/10	$LD_{50} = 67,8 (62,9 \div 72,7)$
	60	1/10	
	70	6/10	
	80	10/10	
Цефотаксим (субстанция)	120	0/10	$LD_{50} = 158,0 (143,1 \div 172,9)$
	140	3/10	
	160	3/10	
	180	10/10	

Примечание. Здесь и табл. 2–4: * — число погибших животных/число животных, взятых в опыт.

Таблица 2. Показатели острой токсичности препарата «Сульцефабол» в опытах на белых мышах (комбинированный препарат, 2:1)

Доза, в/в (в мг суммы действующих веществ на мышь)	Частота* гибели мышей после введения	Расчётные показатели, мг/мышь
70	0/10	$LD_{50} = 103,1 (95,4 \div 111,4)$
80	1/10	
100	3/10	
120	9/10	
140	10/10	

Таблица 3. Показатели острой токсичности субстанций «Ампициллин» и «Оксациллин» в опытах на белых мышах

Препарат	Доза, в/в (в мг действующего вещества на мышь)	Частота* гибели мышей после введения	Расчётные показатели, мг/мышь
Оксациллин (субстанция)	20	0/10	$LD_{50} = 30,6 (27,9 \div 33,1)$
	25	1/10	
	30	5/10	
	35	8/10	
	40	9/10	
	45	10/10	
Ампициллин (субстанция)	60	0/10	$LD_{50} = 96,9 (87,5 \div 105,7)$
	80	1/10	
	100	6/10	
	120	9/10	
	140	10/10	

Таблица 4. Показатели острой токсичности препарата «Ампициллин+Оксациллин» в опытах на белых мышах (комбинированный препарат, 2:1)

Доза, в/в (в мг суммы действующих веществ на мышь)	Частота* гибели мышей после введения	Расчётные показатели, мг/мышь
60	0/10	$LD_{50} = 92,8 (82,8 \div 101,7)$
80	2/10	
100	7/10	
120	9/10	
140	10/10	

на оси координат. Перпендикуляры, восстановленные из этих точек, дали точку пересечения, положение которой оказалось в зоне относительного синергизма, то есть несколько ниже прямой аддитивного взаимодействия, что и отражает характер взаимодействия субстанций в препарате «Сульцефабол» (рис. 1).

Таким образом, в результате проведённого анализа было обнаружено небольшое потенцирование токсического эффекта сульбактама и цефотаксима, входящих в состав комбинированного препарата «Сульцефабол».

Для оценки токсикологического взаимодействия активных веществ в лекарственной форме «Ампициллин+Оксациллин» с помощью комбинационного квадрата величины LD_{50} ампициллина, оксациллина и самой лекарственной формы также были обработаны описанным выше способом.

Ампициллин и оксациллин в исследуемой лекарственной форме объединены в соотношении 2:1, поэтому доли этих субстанций в LD_{50} комбинированного препарата составили в весовых единицах для ампициллина, 61,9 мг/мышь, а для оксациллина — 30,9 мг/мышь. Указанные величины в процентном отношении от соответствующего значения LD_{50} для каждой из субстанций равнялись: для ампициллина — 63,8%, а для оксациллина — 101,1%. Перпендикуляры, восстановленные из координат этих точек, пересеклись в зоне относительного антагонизма — несколько выше прямой аддитивного взаимодействия, что и отражает характер взаимодействия субстанций в препарате «Ампициллин+Оксациллин» (рис. 2).

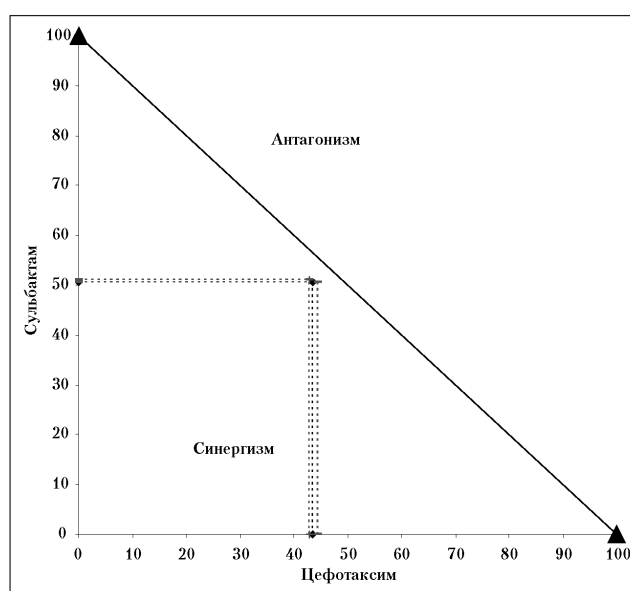


Рис. 1. Оценка в острых опытах на белых мышах характера взаимодействия по острой токсичности действующих веществ сульбактама и цефотаксима в комбинированном препарате «Сульцефабол» производства ООО «АБОЛмед»

Примечание: ▲ — значения LD_{50} , принятые за 100%: по оси ординат LD_{50} сульбактама, по оси абсцисс — значение LD_{50} цефотаксима. ■ — точки на осях координат, соответствующие долям сульбактама и цефотаксима в значении LD_{50} для препарата «Сульцефабол», выраженные в % от собственных значений LD_{50} , и — точка пересечения перпендикуляров, восстановленных из этих точек.

Таким образом, в результате проведённого анализа было обнаружено антагонистическое взаимодействие по токсическому эффекту активных веществ, входящих в состав комбинированного препарата «Ампициллин+Оксациллин».

Согласно второму «вычислительному методу» теоретическая основа прогнозирования безопасности комбинированного применения нескольких лекарственных средств базируется на гипотезе сложения токсичности отдельных компонентов и выражается известным из общей токсикологии уравнением аддитивности [10]:

$$(C_1/M_1 + C_2/M_2 + \dots + C_n/M_n) \times K = 1, (1)$$

где $C_1, C_2, \dots, C_n$ — дозы или концентрации каждого компонента; $M_1, M_2, \dots, M_n$ — их изоэффективные дозы (концентрации) по тому эффекту, который исследуется; K — коэффициент пропорциональности.

При токсикологическом взаимодействии, приводящем к потенцированию токсичности отдельных компонентов, объединённых в лекарственном средстве, коэффициент $K < 1,0$, а при антагонизме $K > 1,0$. При отсутствии эффектов взаимодействия — аддитивном эффекте — $K = 1,0$. Условие изоаддитивности, позволяющее суммировать значения доз компонентов комбинации, предполагает, что отдельные компоненты полностью взаимозаменяемы в пропорциональных долях их изоэффективных доз.

В нашем случае параметру M соответствуют LD_{50} индивидуальных компонентов комбинации. Для удобства вычисления гипотетического значения LD_{50} комбинации (LD_{50} Комбинации (Гип)) предлагается использовать уравнение аддитивности в следующем виде:

$$(d_1/LD_{50\ 1} + d_2/LD_{50\ 2} + \dots + d_n/LD_{50\ n}) = (d_1 + d_2 + \dots + d_n)/LD_{50\ \text{Комбинации (Гип)}} (2)$$

или

$$LD_{50\ \text{Комбинации (Гип)}} = (d_1 + d_2 + \dots + d_n) / (d_1/LD_{50\ 1} + d_2/LD_{50\ 2} + \dots + d_n/LD_{50\ n}) (3)$$

где $d_1, d_2, \dots, d_n$ — абсолютные весовые значения или относительные доли компонентов комбинации; $LD_{50\ 1}, LD_{50\ 2}, LD_{50\ n}$ — значения LD_{50} отдельных компонентов комбинации, полученные в эксперименте.

Отношение фактической экспериментальной LD_{50} комбинации (LD_{50} Комбинации (Факт)) к вычисленному гипотетическому значению LD_{50} комбинации вычисляется по формуле:

$$LD_{50\ \text{Комбинации (Факт)}} / LD_{50\ \text{Комбинации (Гип)}} = K (4),$$

где K равняется 1 ($K=1$), согласно предположению об отсутствии токсикологического взаимодействия (аддитивный эффект).

Анализ результатов проведённого изучения острой токсичности препарата «Сульцефабол» с

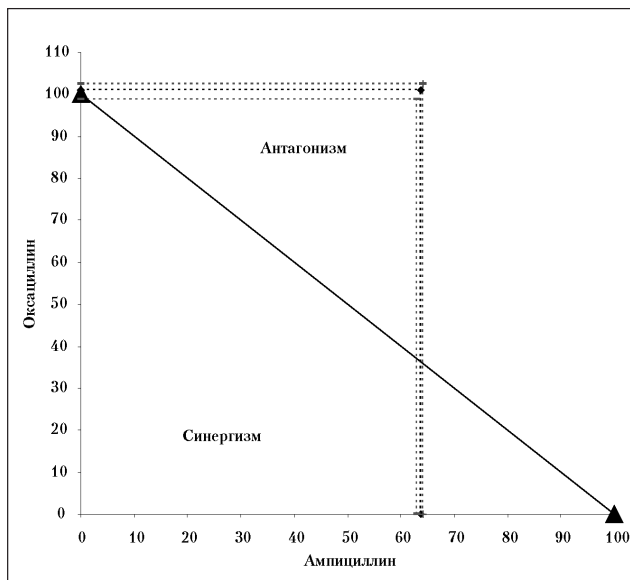


Рис. 2. Оценка в острых опытах на белых мышах характера взаимодействия по острой токсичности действующих веществ ампициллина и оксациллина в комбинированном препарате «Ампициллин + Оксациллин» производства ООО «АБОЛмед».

Примечание. ▲ — значения LD_{50} , принятые за 100%: по оси ординат LD_{50} оксациллина, по оси абсцисс — значение LD_{50} ампициллина. ■ — точки на осях координат, соответствующие долям оксациллина и ампициллина в значении LD_{50} для препарата «Ампициллин + Оксациллин», выраженные в % от собственных значений LD_{50} , и — точка пересечения перпендикуляров, восстановленных из этих точек.

помощью преобразованного уравнения аддитивности позволяет получить цифровое выражение изоболографического анализа по Loewe. Преимуществом вычислительного метода является возможность его применения для анализа не только 2-компонентных комбинаций, но и для комбинаций с любым количеством компонентов. Очевидно также, что результаты, полученные с помощью этих методов, должны совпадать. Проведённые вычисления с использованием токсикометрических параметров, полученных при изучении острой токсичности препарата «Сульцефабол», подтверждают указанное совпадение результатов анализа. Так, при соотношении содержания в препарате субстанций, равном 2:1, формула (3) для вычисления гипотетической LD_{50} комбинированной лекарственной формы приобретает следующий вид:

$$LD_{50\ \text{Сульцефабола (Гип)}} = 3 / (2/158,0 + 1/67,2) = 3 / (0,0127 + 0,0148) = 3 / 0,0275 = 109,1 \text{ (мг/мышь)}.$$

Таким образом, гипотетическое значение LD_{50} препарата «Сульцефабол», соответствующее условию аддитивности, составляет 109,1 мг/мышь, то есть практически не отличается от фактического значения LD_{50} этого препарата, полученного в эксперименте — 103,1 мг/мышь. При этом, коэффи-

циент пропорциональности $K = 103,1/109,1 = 0,95$ также указывает на аддитивный характер токсического действия субстанций в данной комбинации «Цефатоксим+сульбактам» (при соотношении 2:1) с маловероятной тенденцией к синергизму или потенцированию токсических эффектов в результате возможного токсикологического взаимодействия компонентов комбинации.

Аналогичный вывод был сделан по результатам анализа взаимодействия изоболографическим методом по Loewe, что подтверждает идентичность рассматриваемых методов.

Ниже приводятся расчёты гипотетической LD_{50} для лекарственного сочетания «Ампициллин+Оксациллин» при том же соотношении содержания в препарате формирующих его субстанций — 2:1:

$$LD_{50} \text{ «Ампициллин+Оксациллин» (Гип)} = 3/(2/96,9 + 1/30,6) = 3/(0,0206 + 0,0327) = 3/0,0533 = 56,3 \text{ (мг/мышь)}.$$

Таким образом, гипотетическое значение LD_{50} препарата «Ампициллин+Оксациллин», соответствующее условию аддитивности, составляет 56,3 мг/мышь и значительно меньше фактического значения LD_{50} этого препарата, полученного в эксперименте — 92,8 мг/мышь. При этом, полученный коэффициент пропорциональности $K = 92,8/56,3 = 1,64$ указывает на антагонистический характер токсического действия активных веществ в данной комбинации (при антагонизме $K > 1,0$). И в этом случае необходимо указать на тот факт, что по результатам анализа взаимодействия изоболографическим методом по Loewe было установлено аналогичное взаимодействие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под редакцией Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. М.: 2002; 56.
2. Государственный реестр лекарственных средств. М.: 2006; II (типичные клинико-фармакологические статьи): 2: 765.
3. Wang F. D., Lin M. L., Lee W. S., Liu C. Y. *In vitro* activities of beta-lactam antibiotics alone and in combination with sulbactam against Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004 Jun; 23: 6: 590—595.
4. Кузнецова С. М. Ампиокс, ампиокс-натрий. Проспект. М.: ЦБНТИмедпром, 1980; 24.
5. Приказ МЗ СССР № 1045-73 от 6.04.73. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».
6. Приказ МЗ СССР № 1179 от 10. 10. 83. «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».
7. Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 года «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».
8. Бельский М. Л. Элементы количественного анализа фармакологического эффекта.- Л.: Гос. из-во мед. лит., 1963, 152 с.
9. Куценко С. А. Основы токсикологии, С-Пб.: 2002.
10. Общая токсикология / Под ред. Б. А. Курляндского и В. А. Филова), М.: 2002; 608.

Выводы

Предлагаемые комбинации (2:1) активных веществ «Цефатоксим» и «Сульбактам», а также «Ампициллин» и «Оксациллин» имеют ожидаемые характеристики острой токсичности, соответствующие суммарной токсичности компонентов по типу аддитивности ($K = 0,95 \approx 1$) и антагонизма ($K = 1,64 > 1$) соответственно.

Установленный характер совместного токсического действия активных компонентов препаратов «Сульцефабол» и «Ампициллин+Оксациллин» в остром эксперименте позволяет сделать предварительный вывод об отсутствии существенного риска эффектов токсикологического взаимодействия субстанций, входящих в их состав в комбинации 2:1, что свидетельствует о правомочности применения предложенных моделей для оценки безопасности комбинированных лекарственных препаратов.

Вместе с тем следует учитывать, что полученные результаты с использованием LD_{50} в качестве оценочного критерия не исключают иных эффектов токсикологического взаимодействия. Так, не исключаются, например, возможные отклонения от ожидаемого профиля токсичности комбинации по характеру, выраженности и динамике симптомов интоксикации как при остром, так и особенно при хроническом воздействии данной лекарственной комбинации в экспериментах на животных и в клинике. В связи с этим доклиническое изучение безопасности комбинаций лекарственных средств следует проводить не только в условиях острого эксперимента, но и при многократном (субхроническом) введении с регистрацией возможно большего количества разнообразных параметров токсического действия.