

Разработка лабораторной технологии получения клеточной (эритроцитарной) формы цефтриаксона и экспериментальное обоснование целесообразности ее использования при необструктивном пиелонефрите

О.И. Братчиков, Г.В. Сипливый, В.Ю. Ипатов, А.А. Безъязычная, А.В. Кукурека, Л.Е. Сипливая
ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

Сведения об авторах:

Братчиков О.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой урологии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия, bratov45@mail.ru, AuthorID 189415

Bratchikov O.I. – Dr. Sc., professor, Head of the Department of Urology KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia, bratov45@mail.ru

Сипливый Г.В. – д.м.н., профессор кафедры урологии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия, SiplivjyGV@kursksmu.net, AuthorID 436207

Siplivjy G.V. – Dr. Sc., professor at the Department of Urology KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia, SiplivjyGV@kursksmu.net

Ипатов В.Ю. – аспирант кафедры урологии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия

Ipatov V. Yu. – postgraduate student at the Department of Urology KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia

Безъязычная А.А. – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия, AuthorID 894770

Bezieiazchnaya A.A. – postgraduate student at the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia

Кукурека А.В. – к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия, KukurekaAV@kursksmu.net, AuthorID 359995

Kukureka A.V. – PhD, associate professor at the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia, KukurekaAV@kursksmu.net,

ORCID 0000-0002-5244-0636

Сипливая Л.Е. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии КГМУ Минздрава России, Курск, Россия, farmchim@rambler.ru, AuthorID 558776

Siplivaya L.E. – Dr. Sc., professor, Head of the Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry KSMU of Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia, farmchim@rambler.ru

Цефтриаксон является антибиотиком группы цефалоспоринов третьего поколения, при внутримышечном или внутривенном введении он длительно сохраняется в организме и хорошо проникает в органы. Однако применение цефтриаксона может вызывать аллергические реакции, изменение формулы крови, нарушение функции печени и почек и, в связи с этим, применение его в условиях инфекционных воспалительных заболеваний почек, и в частности пиелонефрита, может привести к нежелательным последствиям.

Направленный транспорт лекарственных средств в охваченную патологическим процессом зону позволяет наряду с созданием в ней высокой концентрации препарата максимально снизить нежелательные реакции организма на медикаментозное воздействие, снизить терапевтическую дозу препарата и кратность введения. Реализация идеи направленного транспорта лекарств идет по

линии использования клеток крови в качестве контейнеров для доставки лекарственных средств [1-3].

Цель работы. Разработать систему доставки цефтриаксона с использованием эритроцитарных векторов при необструктивном пиелонефрите для его селективного воздействия на орган с целью повышения эффективности и снижения токсичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на беспородных крысах массой 190-220 г. Все исследования проводились в одинаковых климатических условиях с использованием стандартного пищевого режима вивария. Животных отбирали по возрасту и по массе, разброс которой был в пределах 10%. Экспериментальные крысы при проведении исследований разделили на группы по 8-9 животных. При выполнении эксперимента соблюдались гуманные принципы конвенции по работе с лабо-

раторными животными (Франция 1986 г.).

Инфекционное поражение почек (необструктивный пиелонефрит) моделировали по методике Ю.М. Есилевского, путем внутрибрюшинного введения арахидоновой кислоты в дозе 2,5 мг/кг ежедневно в течение 10 дней, на 10-е сутки внутривенно вводили взвесь культуры кишечной палочки [4]. О состоянии выделительной функции почек судили по концентрации мочевины и креатинина в крови [5]. Активность ферментов в почках и количество клеток крови оценивали по методике В.В. Меньшикова [5]. В ходе приготовления гистологических препаратов использовалась окраска гематоксилином и эозином.

В качестве системы доставки препарата в почки использовали аллогенные эритроциты. Для иммобилизации цефтриаксона в тени эритроцитов использовали метод гипосмотического гемолиза, позволяющий ввести максимально возможное количество препаратов [6,7].

Для получения аллогенных эритроцитов использовали 3 мл крови. После оседания эритроцитов удаляли плазму вместе с лейкоцитарной пленкой. Эритроциты крыс, выделенные из 3 мл крови, дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида путем центрифугирования при 500 g в течение 5 мин при 4°C. Осадок эритроцитов гемолизировали семикратным объемом охлажденной до 0°C воды, очищенной и центрифугировали при 1500 g в течение 25 мин. К полученной строме приливали пятикратный объем цефтриаксона, растворенного в охлажденной до 5°C воде очищенной. Концентрация препарата в инкубационной среде соответствовала его разовой дозе в пересчете на крысу. Взвесь инкубировали в течение 20 мин при 4°C, затем добавляли 1/10 объема 10% натрия хлорида для восстановления целостности стромы и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После включения препаратов в стромальные сферы последние дважды отмывали изотоническим раствором натрия хлорида, затем осаждали при 1500 g в течение 10 мин (эритроцитарная форма). Количественную оценку цефтриаксона проводили в соответствии с нормативной документацией методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В работе использовали цефтриаксон (Индия) в виде раствора для инъекций.

Цефтриаксон и его эритроцитарную форму вводили внутривенно, при этом использовали аллогенный

перенос клеток. Препарат вводили в дозах, соответствующих рекомендованным терапевтическим дозам, пересчитанным с учетом соотношения поверхности тела биологического объекта и его массы по общепринятой формуле межвидового переноса доз с применением коэффициента пересчета в зависимости от массы тела. Антибиотики вводили в хвостовую вену без наркоза. Крысу помещали в специально сконструированную установку. Стеклоканикулярная конструкция позволяла фиксировать крысу, при этом хвост находился вне установки. Перед введением препаратов хвост разогревали обработкой водой с повышенной температурой и этанолом. Для прокола хрящевого панциря использовали тонкую иглу и для точного дозирования применяли инсулиновый шприц.

Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления средних арифметических изучаемых показателей (M) и их стандартных ошибок (m). Существенность различий средних величин оценивали по критериям Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни [8,9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для отработки лабораторной технологии получения эритроцитарной формы цефтриаксона изучены особенности его включения в эритроцитарные носители (ЭН) здоровых животных и животных с пиелонефритом.

С этой целью ЭН здоровых крыс и крыс с пиелонефритом инкубировали с раствором препарата, содержащим 1 и 2 г цефтриаксона, в течение 10, 30 и 60 мин при 4°C. Вначале инкубацию проводили с меньшей концентрацией, а затем концентрацию препарата в инкубационной жидкости увеличивали в два раза. Устойчивость ЭН на десорбцию и выделение препарата из ЭН определяли путем двукратного предварительного отмывания и инкубации их в аутологичной плазме при 37°C в течение 30 мин.

Было установлено, что в ЭН здоровых доноров включается цефтриаксон 23,1%, а в ЭН крыс с пиелонефритом – 21,8%. Полученные результаты показывают, что антибиотик в примерно равной степени включается в ЭН как здоровых, так и крыс с пиелонефритом. Изучение процессов десорбции цефтриаксона из ЭН в плазму крови показало их достаточную устойчивость и тем самым подтвердило возможность использования эритроцитов для направленного транспорта антибактериального препарата.

Установлено, что введение арахидоновой кислоты совместно с микробным агентом вызывало развитие пиелонефрита, подтверждающееся клиническими показателями: повышение температуры, снижение веса на 10% (табл. 1). Анализ выделительной функции почек показал повышение уровня в крови мочевины в 1,9 раза и креатинина в – 3,0 раза, появление лейкоцитов и белка в моче (табл. 2).

Установлено изменение лейкоцитарной формулы крови: увеличение количества лейкоцитов на 25%, уменьшение количества лимфоцитов на 20% и повышение количества нейтрофилов на 21%. В почках отмечено снижение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в 1,7 раза, глутаматдегидрогеназы (ГДГ) – в 1,9 раза, щелочной фосфатазы (ЩФ) – в 2,1 раза, на фоне высокой активности лактатдегидрогеназы

Таблица 1. Изменение температуры и массы тела у животных с необструктивным пиелонефритом

| Группа | Температура тела, °C | Масса тела, г |
|---|----------------------|---------------|
| 1. Контроль (здоровые крысы) | 41,5 ± 0,5 | 163,4 ± 11,8 |
| 2. Введение арахидоновой кислоты и кишечной палочки | 44,1 ± 0,5 | 148,9 ± 9,1 |

Таблица 2. Уровень мочевины и креатинина у животных с необструктивным пиелонефритом

| Группа | Мочевина, ммоль/л | Креатинин, ммоль/л |
|---|-------------------|--------------------|
| 1. Контроль (здоровые крысы) | 7,8 ± 0,6 | 0,08 ± 0,01 |
| 2. Введение арахидоновой кислоты + кишечная палочка | 15,2 ± 1,3 * | 0,25 ± 0,02 * |

Примечание * – достоверность различий между группами (p ≤ 0,05).

(ЛДГ). Анализ патологических изменений в мозговом слое почек показал очаговые некрозы и очаговые скопления лейкоцитов.

Полученные результаты свидетельствовали о развитии инфекционного воспалительного процесса в почках, весьма близкого к естественной картине пиелонефрита.

Для сравнительной оценки эффективности свободной и клеточной формы цефтриаксона при экспериментальном пиелонефрите использовали внутривенное введение разовых доз препаратов, пересчитанных по общепринятой методике на крысу. При этом температуру тела определяли один раз в сутки в одно и то же время (9 – 10 ч) до ее полной нормализации и последующие два дня, выделительную функцию почек и массу тела определяли на четвертый и последующие дни. Лабораторные показатели определяли во всех группах на 10 сутки после развития пиелонефрита.

Установлено, что пятикратное введение животным с пиелонефритом цефтриаксона в дозе 20 мг/кг и 10 мг/кг, нормализовало температуру тела на 10-12-е сутки, выделительную функцию почек на 12-14 сутки, соответственно, при этом вес животных достоверно не изменялся. На 10-е сутки в крови количество лейкоцитов было повышено в среднем на 10-12%, количество лимфоцитов снижено на 8-9%, количество нейтрофилов не изменялось, уменьшался, но не нормализовался дисбаланс активности ферментов в почках.

В отличие от этого однократное введение крысам с пиелонефритом эритроцитарной формы цефтриаксона в разовой дозе и дозе в два раза меньшей (20 мг/кг; 10 мг/кг) нормализовало температуру тела на 5 – 6 и 6 – 7 сутки, соответственно, выделительную функцию почек на 5-6 и 6-7 сутки, на 10 сутки отмечена полная нормализация количества лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов в крови, активности ферментов в почках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами разработана лабораторная технология получения эритроцитарной формы цефтриаксона, включающая выделение ЭН, получение стандартизированной по количеству действующего вещества клеточной формы антибактериального препарата.

Установлены особенности включения цефтриаксона в эритроцитарные носители здоровых животных и крыс с пиелонефритом. Показано, что примерно равное включение цефтриаксона происходит при использовании эритроцитарных носителей здоровых крыс и крыс с пиелонефритом, что дает возможность избежать использования донорской крови. Установлена достаточная устойчивость эритроцитарных носителей с включенным цефтриаксоном, что позволяет их использовать в качестве контейнеров для направленного транспорта антибиотика в органы и, в частности, в почки.

Общеизвестно, что инфекционный воспалительный процесс в почках возникает при попадании микробного агента на фоне нарушения уро- или гемодинамики почек [4]. Экспериментальный пиелонефрит моделировали введением токсического и микробного агентов: арахидоновой кислоты и кишечной палочки. Развитие экспериментального пиелонефрита подтверждалось клиническими показателями (гипертермия, снижение веса, нарушение выделительной активности), изменение лейкоцитарной формулы, появлением в почках микроабсцессов из скопления лейкоцитов, разбалансированием активности почечных ферментов. Механизм развития пиелонефрита в выбранной модели, по-видимому, можно объяснить нарушением внутривисцерального кровотока, который возникает за счет повреждающего действия на почечную ткань (арахидоновая кислота), что приво-

дит к фиксации микроорганизмов в почках. Оценка эффективности свободной и клеточной форм цефтриаксона при экспериментальном пиелонефрите показало, что введение эритроцитарной формы, в соответствующих его системному введению дозах, оказывало более существенный фармакологический эффект, что выражалось в более ранней нормализации (5-7 сутки) клинических, лабораторных, гематологических и морфологических показателей.

Таким образом, была разработана система доставки цефтриаксона с использованием эритроцитарных носителей при необструктивном пиелонефрите.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальное моделирование пиелонефрита подтверждено развитием клинических, лабораторных, гематологических признаков воспалительного процесса в почках, снижением в почках активности СДГ, ГДГ, ЩФ в 1,7 – 2,1 раза на фоне высокой активности ЛДГ.

2. Системное введение цефтриаксона (20 мг/кг) 1 раз в сутки курсом 5 дней после моделирования пиелонефрита нормализовало температуру тела, выделительную функцию, стабилизировало гематологические показатели, уменьшался дисбаланс активности ферментов и морфологические показатели в почках к 10-12 суткам наблюдения.

3. Однократное введение эритроцитарной формы цефтриаксона в дозе, соответствующей его системному однократному введению (20 мг/кг) и в дозе в два раза меньшей, оказывало более существенный фармакологический эффект по сравнению с традиционным способом, что выражалось в более ранней нормализации (на 5 – 7 сутки) клинических, лабораторных, морфологических показателей. ■

Ключевые слова: пиелонефрит, цефтриаксон, эритроцитарная форма цефтриаксона.

Key words: pyelonephritis, ceftriaxone, erythrocyte form of ceftriaxone.

DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-2-34-37

Резюме:

Введение. Цефтриаксон является эффективным антибиотиком группы цефалоспоринов, однако его применение может привести к нежелательным последствиям. Направленный транспорт лекарственных средств позволяет снизить эти последствия, терапевтическую дозу препарата и кратность введения.

Цель: разработать систему доставки цефтриаксона с использованием эритроцитарных векторов при необструктивном пиелонефрите для его селективного воздействия на орган с целью повышения эффективности и снижения токсичности.

Материалы и методы. Исследования проведены на крысах, не-обструктивный пиелонефрит моделировали путем внутрибрюшинного введения арахидоновой кислоты и кишечной палочки. О состоянии выделительной функции почек судили по концентрации мочевины и креатинина в крови. Для включения цефтриаксона в строму эритроцитов использовали метод гипоосмотического гемолиза. Количественную оценку цефтриаксона проводили методом.

Результаты. Установлено, что пятикратное введение животным с пиелонефритом цефтриаксона нормализовало температуру тела на 10-12-е сутки, выделительную функцию почек – на 12-14-е сутки. Количество лейкоцитов было повышено, количество лимфоцитов снижено, количество нейтрофилов не изменялось, уменьшался, но не нормализовался дисбаланс активности ферментов в почках. Однократное введение крысам с пиелонефритом эритроцитарной формы цефтриаксона нормализовало температуру тела на 5-7-е сутки, выделительную функцию почек – на 5-8-е сутки, соответственно, на 10-е сутки отмечена полная нормализация количества лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов в крови, активности ферментов в почках.

Заключение. Таким образом, была разработана система доставки цефтриаксона с использованием эритроцитарных носителей при не-обструктивном пиелонефрите.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Summary:

Development of laboratory technology for obtaining the cellular (erythrocyte) form of ceftriaxone and experimental substantiation of the feasibility of its use in non-obstructive pyelonephritis

O.I. Bratchikov, G.V. Sipliviy, V.Yu. Ipatov, A.A. Bezieiazchnaya, A.V. Kukureka, L.E. Siplivaya

Introduction. Ceftriaxone is an effective cephalosporin antibiotic, but its use can lead to undesirable effects. Directed transport of drugs reduces these effects, the therapeutic dose of the drug and the frequency of administration. Aim. To develop a ceftriaxone delivery system using erythrocyte vectors for non-obstructive pyelonephritis to selectively affect the organ in order to increase its efficiency and reduce toxicity.

Materials and methods. Studies conducted on rats, non-obstructive pyelonephritis was modeled by intraperitoneal administration of arachidonic acid. The state of the excretory function of the kidneys was judged by the concentration of urea and creatinine in the blood. To incorporate ceftriaxone into the erythrocyte stroma, the method of hypoosmotic hemolysis was used. Ceftriaxone was quantitated by HPLC.

Results. It was established that five-fold administration of ceftriaxone to animals with pyelonephritis normalized body temperature for 10-12 days, excretory kidney function for 12-14 days. The number of leukocytes was increased, the number of lymphocytes decreased, the number of neutrophils did not change, decreased, but the imbalance of enzyme activity in the kidneys did not normalize. A single administration of erythrocyte form of ceftriaxone to rats with pyelonephritis normalized body temperature for 5-7 days, excretory kidney function – for 5-8 days, respectively, on the 10th day full normalization of the number of leukocytes, lymphocytes, neutrophils in the blood, activity was noted enzymes in the kidney.

Conclusion. Thus, a ceftriaxone delivery system was developed using erythrocyte carriers for non-obstructive pyelonephritis.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сагитова Д.С., Мухиддинов Н.Д., Веселов Ю.Е. Направленный транспорт лекарственно модифицированных элементов крови в профилактике и лечении осложнений острого панкреатита воспалительной и травматической этиологии. *Здравоохранение Таджикистана* 2008;(1-2):22-26.
2. Братчиков О.И. Иммуномодулирующая, гепатопротекторная и антиоксидантная активность иммобилизованных форм аминогликозидных антибиотиков при токсическом поражении почек, осложненном стафилококковой инфекцией. *Урология* 2008;5:8-11.
3. Vitvitsky V.M. Anion permeability and erythrocyte swelling. *Bioelectrochemistry* 2000;52(2):169-176.
4. Есилевский Ю.М. Патогенез пиелонефрита. М.: МЕДпресс-информ, 2007; 368 с.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина, 1987; 365 с.
6. Генинг Т.П., Колкер И.И., Жумадилов Ж.Ш. Использование форменных элементов крови для направленной доставки химиотерапевтических и диагностических препаратов в очаг поражения. *Антибиотики и химиотерапия* 1988;33(11):867-870.
7. Жумадилов Ж.Ш., Макаренко Р.В. Особенности включения некоторых антибиотиков в эритроцитарные тени – систему целенаправленной доставки химиотерапевтических препаратов. *Антибиотики и химиотерапия* 1990;35(11):54-56.
8. Гублер Б.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978; 294 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980; 293 с.

REFERENCES (1, 2, 4-9)

1. Sagitova D.S., Muhiddinov N.D., Veselov Ju.E. Napravlenyj transport lekarstvenno modifitsirovannyh jelementov krovi v profilaktike i lechenii oslozhnenij ostrogo pankreatita vospalitel'noj i travmaticheskoj jetiologii. [Directed transport of drug-modified blood elements in the prevention and treatment of complications of acute pancreatitis of inflammatory and traumatic etiology]. *Zdravoohranenie Tadjzhikistana* 2008;(1-2):22-26. (In Russian)
2. Bratchikov O.I. Immunomodulirujushhaja, gepatoprotekturnaja i antioksidantnaja aktivnost' immobilizirovannyh form aminoglikozidnyh antibiotikov pri toksicheskom porazhenii pochek, oslozhnennom stafilokokkovoy infekciey. [Immunomodulating, hepato-protective and antioxidant activity of immobilized forms of aminoglycoside antibiotics in toxic damage to the kidneys complicated with staphylococcal infection]. *Urologiya* 2008;5:8-11. (In Russian)
4. Esilevskij Ju.M. Patogeneza pielonefrita. [Pathogenesis of pyelonephritis]. M.: MEDpress-inform, 2007; 368 p. (In Russian)
5. Men'shikov V.V. Laboratornye metody issledovanija v klinike: spravochnik. [Laboratory research methods in the clinic: a handbook.]. M.: Medicina, 1987; 365 p. (In Russian)
6. Gening T.P., Kolker I.I., Zhumadilov Zh.Sh. Ispol'zovanie formennyh yelementov krovi dlya napravlennoj dostavki himioterapevticheskikh i diagnosticheskikh preparatov v ochag porazheniya. [The use of blood cells for the targeted delivery of chemotherapeutic and diagnostic products to the lesion]. *Antibiotiki i himioterapija* 1988;33(11):867-870. (In Russian)
7. Zhumadilov Zh.Sh., Makarenkova R.V. Osobennosti vkljucheniya nekotoryh antibiotikov v eritrocitarnye teni – sistemu celenappravlennoj dostavki himioterapevticheskikh preparatov. [Features of the inclusion of some antibiotics in erythrocyte shadows – a system of targeted delivery of chemotherapeutic drugs]. *Antibiotiki i himioterapija* 1990;35(11):54-56. (In Russian)
8. Gubler B.V. Vychislitel'nye metody analiza i raspoznavaniya patologicheskikh processov. [Computational methods of analysis and recognition of pathological processes]. L.: Medicina; 1978. 294 p. (In Russian)
9. Lakin G.F. Biometrija. [Biometry]. M.: Vysshaja shkola; 1980. 293 p. (In Russian)