

УДК 615.45, 615.21/26

DOI: 10.15372/KhUR2024557

EDN: XUCSUE

Безопасность применения аэрозольной формы антибиотиков цефалоспоринового ряда для легких (экспериментальное исследование)

С. В. АНЬКОВ^{1,2}, М. С. БОРИСОВА¹, Т. Г. ТОЛСТИКОВА^{1,2}, А. М. БАКЛАНОВ², С. В. ВАЛИУЛИН²¹Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

E-mail: sergey.ankov42@gmail.com

²Институт химической кинетики и горения СО РАН,
Новосибирск, Россия

(Поступила 05.10.2023; после доработки 12.12.23, принята к печати 22.12.2023)

Аннотация

Проведена оценка безопасности применения аэрозолей антибиотиков цефалоспоринового ряда по результатам гистологического исследования легких при ингаляциях различной длительности. Установлено, что длительная ингаляция не оказывает токсического влияния на легкие.

Ключевые слова: аэрозоль, цефазолин, цефуроксим, цефотаксим, гистология, мышцы, легкие

ВВЕДЕНИЕ

Аэрозольная доставка лекарственных средств является одним из наиболее перспективных методов улучшения фармакологических свойств и расширения области их применения [1–4]. Она позволяет достигать более высоких концентраций лекарственных веществ в легких по сравнению с иными способами доставки, а также снижать количество побочных эффектов [5, 6]. Ранее проведенные исследования аэрозольной доставки лекарственных веществ с генерацией аэрозоля термоконденсационным методом показали свою высокую терапевтическую эффективность. Установлено, что аэрозоли нестероидных противовоспалительных средств, таких как ибупрофен, индометацин и диклофенак, проявляют анальгетическую и противовоспалительную активность в экспериментах на мышах в дозе существенно более низкой, чем при пероральном способе введения [7–9].

Ввиду высокой эффективности аэрозольной доставки в низких дозах, а как следствие, сниженной токсичности, активно изучается аэрозольная форма противотуберкулезных и антибактериальных лекарственных средств [10–14]. При ингаляциях изониазида и пипразинамида в качестве препаратов первой линии при терапии туберкулеза в экспериментах на животных (мышях) в сыворотке крови и легких выявлены фармакокинетические показатели, близкие к таковым для пероральной формы, но в дозах ниже традиционного способа введения. Аэрозольный способ доставки для лечения туберкулеза легких перспективен еще и потому, что лекарственное средство доставляется непосредственно в орган-мишень (легкие) и создает там высокую концентрацию. Все описанные ранее вещества были получены термоконденсационным методом (т. е. путем нагрева исходной субстанции и ее расплавления) и последующей нуклеацией пе-

ренасыщенного пара на затравочных частицах хлорида натрия. Используемая в наших работах установка [9] позволяет получать сухой аэрозоль с частицами размером от 5 до 1000 нм. Помимо повышения эффективности противотуберкулезных лекарственных средств, существует также проблема терапии бактериальных инфекций легких, для лечения которых используют антибиотики широкого спектра цефалоспоринового ряда. Так как цефалоспориновые антибиотики являются термолабильными, технология получения аэрозолей методом нагрева для них не подходит. Поэтому на примере цефазолина была разработана технология получения сухого аэрозоля из раствора цефазолина методом ультразвукового распыления с последующим осушением капель до образования сухого аэрозоля с размером частиц от 80 до 1400 нм [15].

Поскольку аэрозольные формы как противотуберкулезных, так и противомикробных лекарственных средств проявили высокую специфическую активность в аэрозольной форме [16–19], важно установить влияние аэрозольной терапии на структуру ткани органа-мишени (легкие). Гистоморфологическое исследование легочной ткани после длительного воздействия аэрозольной формы цефалоспориновых антибиотиков позволит оценить безопасность и возможность длительного терапевтического применения новой лекарственной формы.

Цель работы – определить токсическое влияние аэрозольной формы антибиотиков цефалоспоринового ряда на легкие экспериментальных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на аутбредных мышках-самцах CD-1 массой тела 20–30 г первой категории конвенциональности. Животные содержались в стандартных условиях при неограниченном доступе к воде и гранулированному корму.

Все манипуляции с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, ГОСТ 33647-2015 “Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения”), решением “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения

лекарственных средств” от 03.11.2016 г. № 81 и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях. Протокол исследования на животных был одобрен Этическим комитетом Института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (протокол № П-05-06.2022-14, утверждено 5 июня 2022 года).

Исследуемые соединения – цефазолин, цефотаксим и цефутоксим (ОАО “Синтез”, Россия) – вводили в виде сухого аэрозоля, получаемого ультразвуковым методом с последующим осушением капель на установке, разработанной на базе Института химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск) в лаборатории наночастиц. Длительность экспозиции для аэрозоля цефазолина составила 20 мин. Легкие у животных забирали сразу (0 ч), через 2 и 24 ч после окончания ингаляции (опытная группа). Также легкие забирали у животных, которые прибывали в камере без аэрозоля, вдыхая чистый воздух (контрольная группа). Длительность ингаляции цефотаксима составила 20, 120 и 220 мин, а цефутоксима – 100 и 220 мин, по истечении которых у животных также отбирали легкие для дальнейшего гистологического исследования. На каждую временную точку отбирали по 4 особи. Таким образом, общее количество животных для эксперимента составило 44.

Легкие фиксировали в забуференном растворе формалина, затем подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе Microm (Carl Zeiss, Германия) с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ проводили методом световой микроскопии в проходящем свете на микроскопе Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия), увеличение $\times 50$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние аэрозольной формы цефазолина на состояние ткани легких

На основании проведенных гистоморфологических исследований структуры тканей легких животных после 20-минутного нахождения в камере без аэрозоля (рис. 1) или с аэрозолем цефазолина (рис. 2) наблюдалась схожая морфологическая картина. Для тканей, взятых непосредственно после ингаляции, отмечалось умеренное или резкое полнокровие отдельных со-

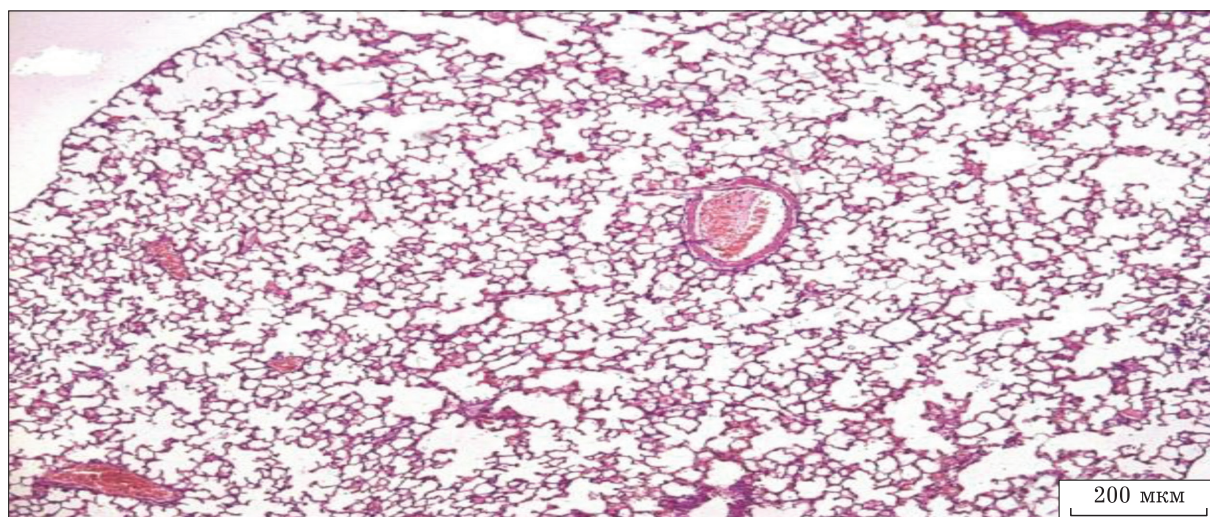


Рис. 1. Срез ткани легкого животного, взятого непосредственно после ингаляции воздуха. Умеренное полнокровие сосудов.

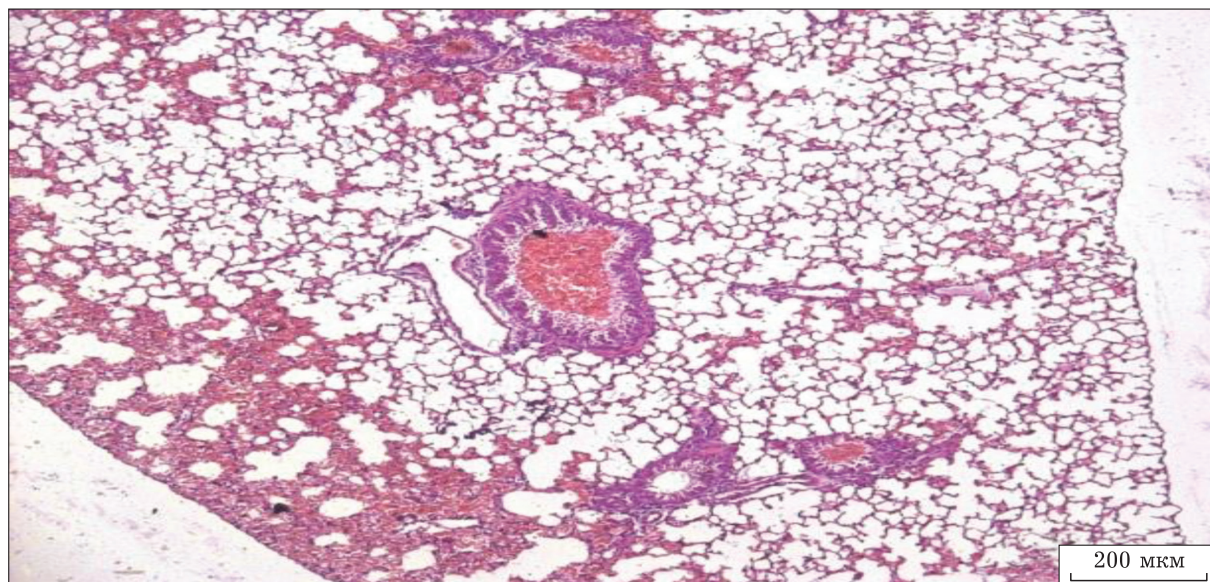


Рис. 2. Срез ткани легкого животного, взятого непосредственно после ингаляции цефазолина. Просветы бронхов заполнены массами эритроцитов. Очаговое кровоизлияние в легочной паренхиме.

судов легких, однако тканевых и жировых эмбол в сосудах выявлено не было. Сосудистые стенки имели нормальное строение без признаков отека. Воздушность легочной паренхимы животных в целом сохранена, признаков эмфиземы или спадения также выявлено не было. На некоторых срезах независимо от экспериментальной группы определялись мелко- или крупноочаговые кровоизлияния в альвеолярных ходах, а также мелкоочаговые отложения фибрина. Межальвеолярные перегородки не утолщены, в просвете отдельных бронхов выявлялись эритроцитарные массы. Структура бронхиальных стенок без патологических изменений. Аналогичная картина

наблюдалась для тканей, взятых через 2 и 24 ч после ингаляции (рис. 3 и 4 соответственно).

Таким образом, непосредственно после ингаляции аэрозоля цефазолина, а также через 2 и 24 часа архитектоника ткани легких животных сохранена, существенных патологических изменений не наблюдалось. Выявленные в результате гистологического исследования полнокровие сосудов, кровоизлияния в респираторном отделе легких, а также массы эритроцитов в бронхах, по всей видимости, являются результатами воздействия при умерщвлении животных и не связаны с действием вводимого вещества.

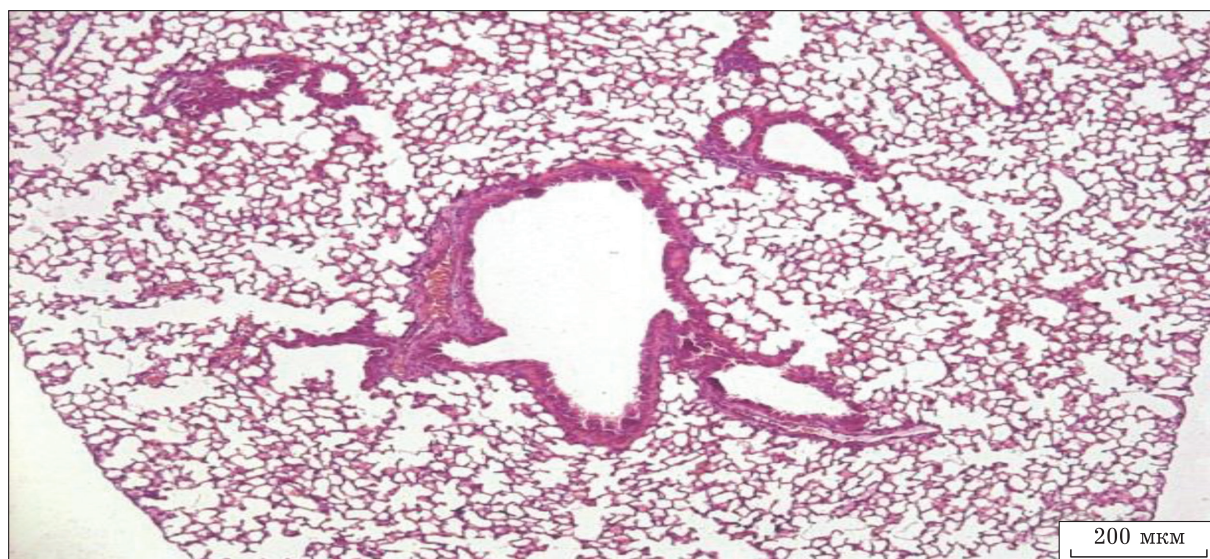


Рис. 3. Срез ткани легкого животного, взятого через 2 ч. после ингаляции цефазолина. Фокальные отложения фибрина в альвеолярных ходах.

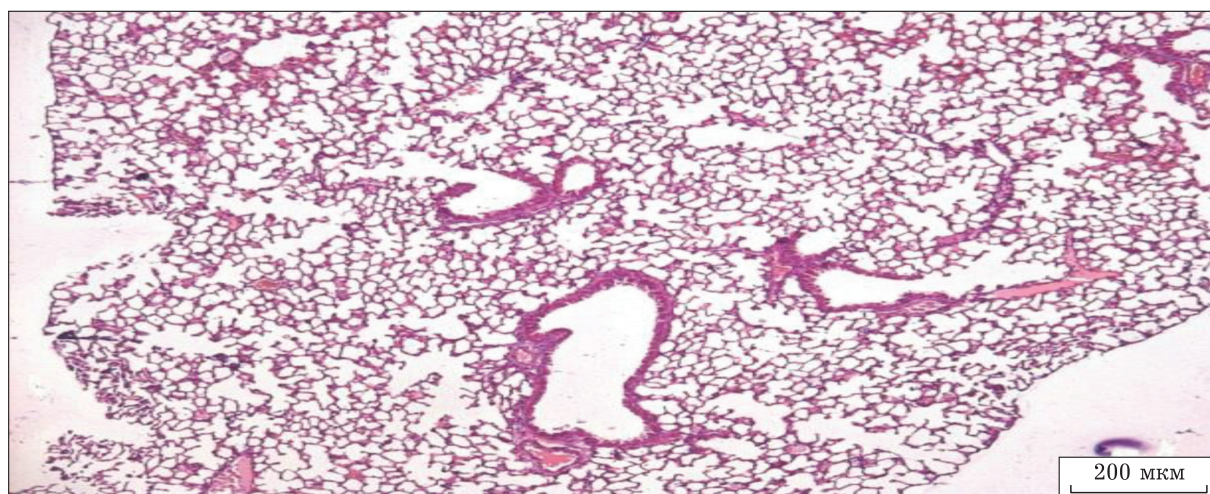


Рис. 4. Срез ткани легкого животного, взятого через 24 ч. после ингаляции цефазолина. Отложения фибрина в отдельных сосудах и фокально в альвеолах.

Влияние аэрозольной формы цефотаксима на легкие мышей

В группе животных, где длительность ингаляции цефотаксима составляла 20 мин (рис. 5), структура легочной ткани на всех гистологических препаратах сохранена. Наблюдается полнокровие части вен, в отдельных сосудах определяются гомогенные или нитевидные эозинофильные отложения, по всей видимости, представляющие собой фибрин. Жировые и тканевые эмболы отсутствуют. Строение сосудистых стенок без патологических изменений. В легочной паренхиме признаков эмфиземы или спадения не обнаружено, воздушность ткани

сохранена. Межальвеолярные перегородки не утолщены. Просвет бронхов свободный, отмечается незначительная десквамация эпителия.

На двух других гистологических препаратах альвеолярные ходы в значительной мере заполнены эритроцитарными массами, у стенок альвеол определяется фибрин, гиалиновые мембраны. Также отмечаются фокальные мелкоочаговые периваскулярные инфильтрации. Массы эритроцитов и белков плазмы обнаруживаются также в бронхах наряду с отшелушивающимся эпителием. Строение бронхиальных стенок нормальное. Возникновение патологических признаков, таких как наличие кровяных телец и отложений фибрина и гиалина в бронхах и респираторном от-

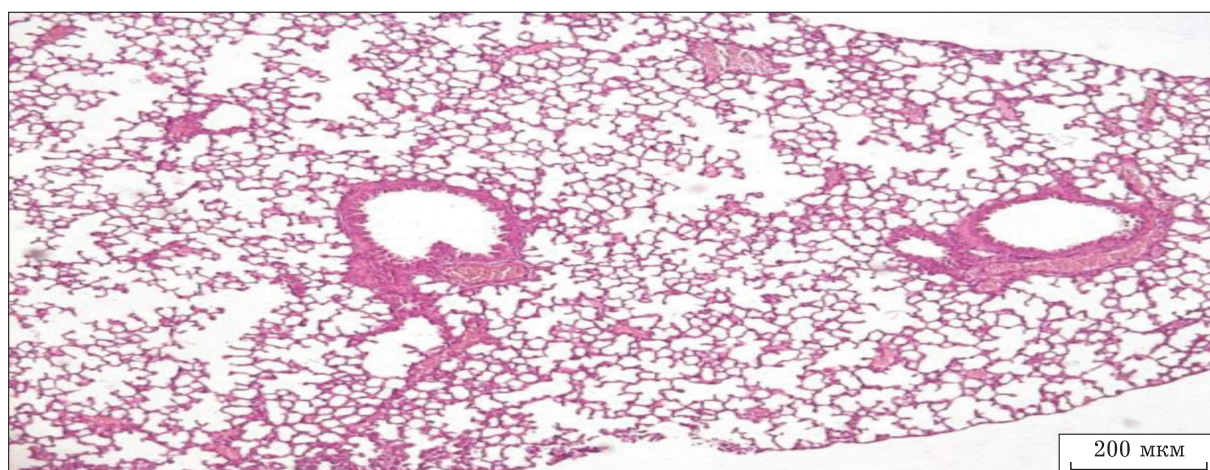


Рис. 5. Срез ткани легкого мыши после ингаляции цефотаксима в течение 20 мин. Венозное полнокровие. В просвете некоторых сосудов и на стенках альвеол – отложения фибрина и белков плазмы.

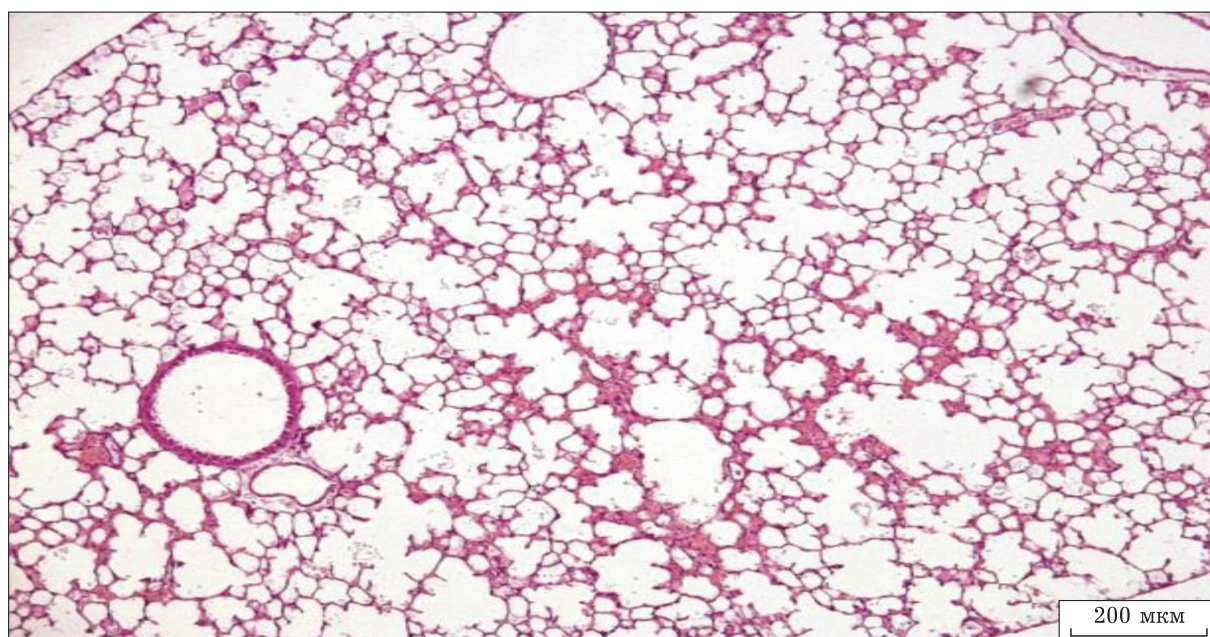


Рис. 6. Срез ткани легкого мыши после ингаляции цефотаксима в течение 120 мин. Мелкоочаговые кровоизлияния, отложения фибрина в альвеолах.

деле легких, вероятно, является результатом манипуляций, произведенных при умерщвлении животных.

В группе мышей, в которой длительность ингаляции цефотаксима составляла 120 мин (рис. 6), морфологическая картина в целом напоминает наблюдавшуюся в первой группе. Также наблюдается умеренное или резкое полнокровие части сосудов, в некоторых сосудах выявляются отложения однородных масс фибрина и белков плазмы. Сосудистая стенка имеет нормальное строение. На двух гистологических препаратах из четырех определяются мелкоочаговые крово-

излияния в легочной паренхиме, на других двух гистологических препаратах эритроцитарные массы занимают значительную площадь в паренхиме. Межальвеолярные перегородки не утолщены. У стенок альвеол визуальное в больших количествах, чем в группе 20-минутной ингаляции цефотаксима, выявляются отложения белков крови, что может свидетельствовать о развитии патологического процесса в альвеолах. Наблюдаются мелкоочаговые лейкоцитарные инфильтрации. В части бронхов, как и в предыдущей группе, определяется десквамированный эпителий, фибрин и эритроциты, а также немного-

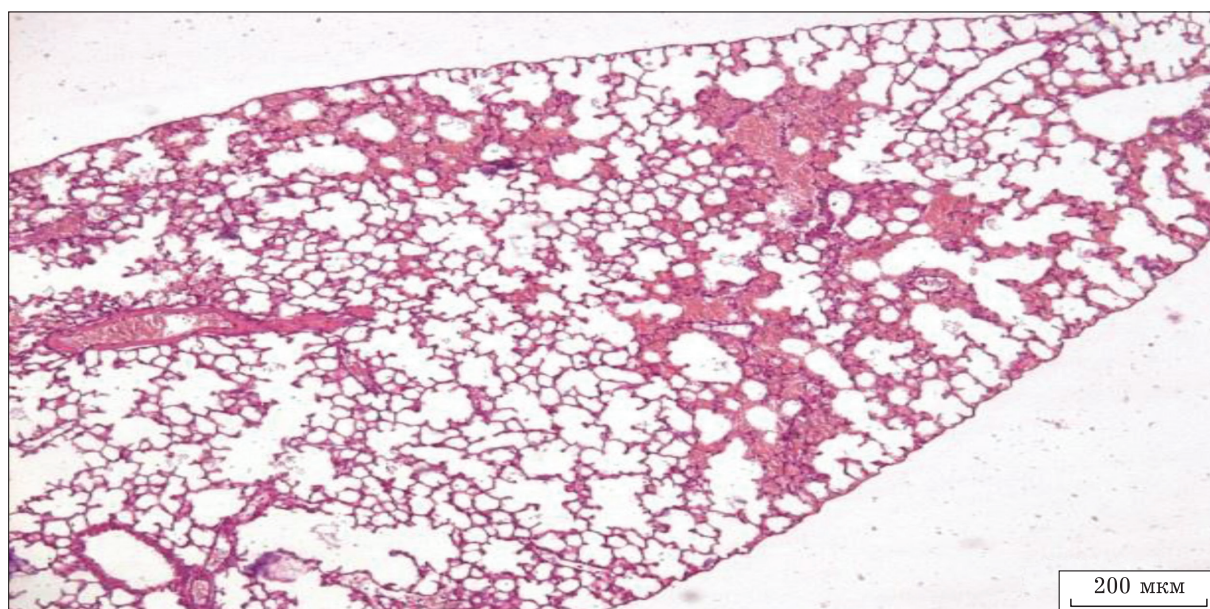


Рис. 7. Срез ткани легкого мыши после ингаляции цефотаксима в течение 220 мин. Геморрагии в легочной паренхиме. Умеренное полнокровие сосудов.

численные лейкоциты. Бронхиальная стенка без патологических изменений.

Аналогичная картина наблюдается в группе животных, где длительность ингаляции составляла 220 мин (рис. 7). Кровенаполнение части сосудов умеренное или резкое, просвет других сосудов остается свободным. На одном гистологическом препарате из трех кровоизлияния в легочной паренхиме мелкоочаговые, на двух других – крупноочаговые. Появление геморагий сопровождается образованием скоплений фибрина, белков плазмы в респираторном отделе и в бронхах. Стенка бронхов не изменена.

Таким образом, на основании имеющихся данных нельзя судить о каких-то определенных токсических нарушениях, вызванных ингаляцией цефотаксима. Частичное венозное полнокровие, образование скоплений белков крови в капиллярах и венах могут свидетельствовать о локальном нарушении венозного оттока, вызванном влиянием условий эксперимента (нахождения в приборе) на животных, но также эти признаки могли возникнуть и вследствие декапитации. То же можно отметить и об отложении фибрина и гиалиновых мембран на стенках альвеол. Незначительные лейкоцитарные инфильтрации в свою очередь не позволяют делать вывод о наличии выраженного воспалительного процесса. Поскольку 20-минутная ингаляция цефазолином и цефотаксимом структурных изменений тканей легких не вызывала, в последую-

щем эксперименте были использованы только длительные экспозиции.

Влияние аэрозольной формы цефуроксима на состояние ткани легких после ингаляции

В группе животных после ингаляции цефуроксима в течение 100 мин (рис. 8) структура ткани легких сохранена. Наблюдается неравномерное кровенаполнение сосудов, строение сосудистых стенок без патологических изменений, жировые и тканевые эмболы в дыхательных путях отсутствуют. Воздушность легочной паренхимы в целом сохранена. В респираторном отделе легкого наблюдаются мелко-, средне- и крупноочаговые кровоизлияния. В области крупноочагового кровоизлияния просветы альвеолярных мешков выглядят расширенными, однако межальвеолярные перегородки имеют нормальную толщину и булабовидную форму. Лейкоцитарные инфильтрации в ткани легких отсутствуют. В просвете отдельных бронхов определяются эритроцитарные массы, отмечается десквамация бронхиального эпителия, стенки бронхов имеют нормальное строение.

В группе животных после ингаляции цефуроксима в течение 220 мин (рис. 9) ткань легких сохраняет нормальное строение. Кровенаполнение сосудов, как и в предыдущей группе, неравномерное, структура сосудистых стенок без изменений. Воздушность легочной паренхимы

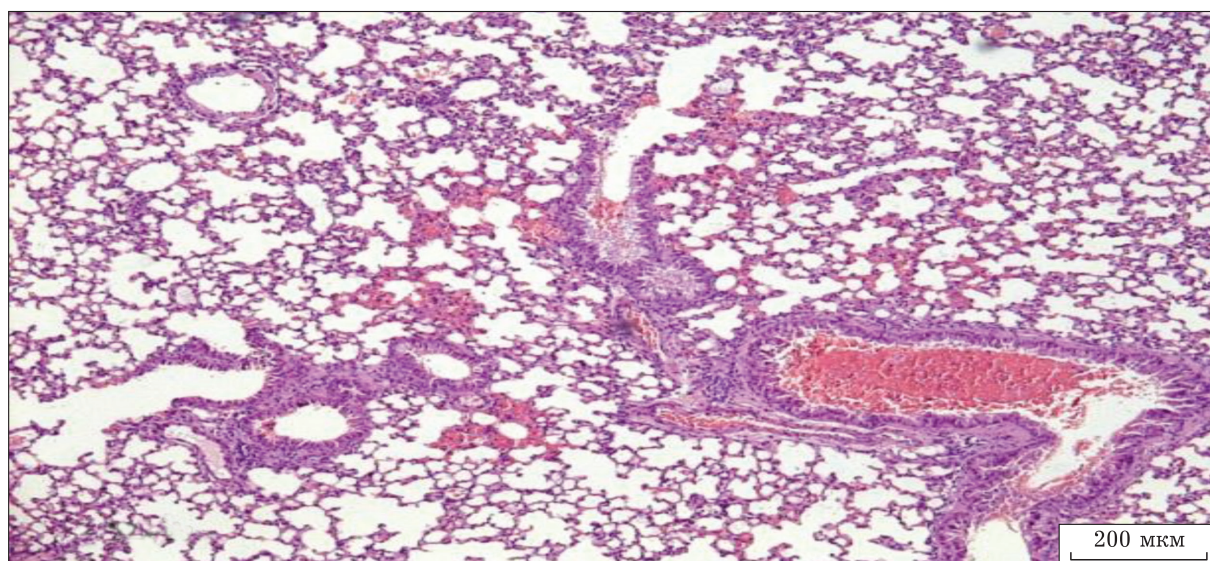


Рис. 8. Срез ткани легкого животного после ингаляции цефуроксима в течение 100 мин. Умеренное полнокровие вен. Мелкоочаговые кровоизлияния в легочной паренхиме. Эритроцитарные массы и десквамированный эпителий в просвете бронхов.

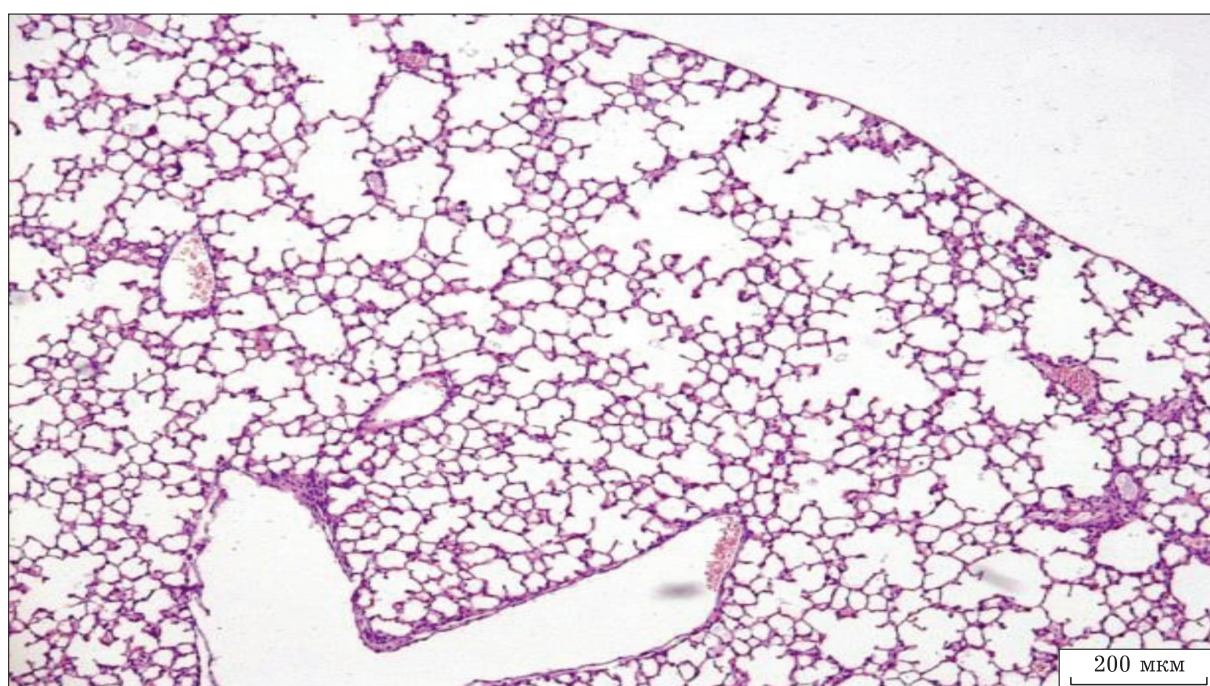


Рис. 9. Срез ткани легкого животного после ингаляции цефуроксима в течение 220 мин. Умеренное полнокровие отдельных вен.

также сохранена. В респираторном отделе легкого определяются мелкоочаговые кровоизлияния, а также фокально – незначительные отложения волокон фибрина. Межальвеолярные перегородки не утолщенные. Признаки воспаления в респираторном отделе легких отсутствуют. В отдельных бронхах обнаруживаются единичные эритроциты. Бронхиальные стенки имеют

нормальное строение, наблюдается частичная десквамация эпителия.

В результате гистологического исследования каких-либо закономерных изменений в легочной ткани, зависящих от длительности ингаляции цефуроксима, выявлено не было. У животных обеих групп архитектура ткани легких сохранена, в качестве патологических измене-

ний были обнаружены кровоизлияния в паренхиме легких, а также эритроциты в просветах бронхов, что, по всей видимости, связано с воздействиями случайных факторов, в частности с манипуляциями при умерщвлении животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из представленных данных, введение аэрозольной формы цефалоспориновых антибиотиков не оказывает необратимых токсических воздействий на структуру ткани легких. Последствия как кратковременного аэрозольного воздействия цефазолина (20 мин), так и длительного (120 и 220 мин) воздействия цефотаксима и цефуроксима носят обратимый характер и не имеют существенных различий. Все структурные и патологические изменения связаны не столько с воздействием аэрозольной формы препаратов, сколько с самим процессом забора биоматериалов. Таким образом, аэрозольная форма доставки цефалоспориновых антибиотиков не только эффективна для лечения бактериальных инфекций, но и безопасна для длительной терапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-73-10143, <https://rscf.ru/en/project/19-73-10143/>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology / A. J. Hickey (Ed.). 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2003. P. 541–550.
- 2 Quon B. S., Goss C. H., Ramsey B. W. Inhaled antibiotics for lower airway infections // *Annals Am. Thorac. Soc.* 2014. Vol. 11, No. 3. P. 425–434.
- 3 Patil J. S., Sarasij S. Pulmonary drug delivery strategies: a concise, systematic review // *Lung India.* 2012. Vol. 29, No. 1. P. 44–49.
- 4 Sabuj M. Z. R., Islam N. Inhaled antibiotic-loaded polymeric nanoparticles for the management of lower respiratory tract infections // *Nanoscale Adv.* 2021. Vol. 3, No. 14. P. 4005–4018.
- 5 Restrepo M. I., Keyt H., Reyes L. F. Aerosolized antibiotics // *Respir. Care.* 2015. Vol. 60, No. 6. P. 762–773.
- 6 Weers J. Inhaled antimicrobial therapy – barriers to effective treatment // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2015. Vol. 85. P. 24–43.
- 7 Аньков С. В., Толстикова Т. Г., Хвостов М. В., Онищук А. А., Бакланов А. М., Болдырев В. В. Влияние наноаэрозольной формы лекарственных препаратов на их базовую активность // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2014. Т. 22, № 3. С. 223–227.
- 8 Аньков С. В., Толстикова Т. Г., Онищук А. А., Хвостов М. В., Сорокина И. В., Бакланов А. М., Фомин В. М., Болдырев В. В. Анальгетический эффект наноаэрозольной формы некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов // *Хим.-фармацевт. журн.* 2015. Т. 49, № 10. С. 37–39.
- 9 Onischuk A. A., Tolstikova T. G., An'kov S. V., Baklanov A. M., Valiulin S. V., Khvostov M. V., Sorokina I. V., Dultseva G. G., Zhukova N. A. Ibuprofen, indomethacin and diclofenac sodium nanoaerosol: generation, inhalation delivery and biological effects in mice and rats // *J. Aerosol Sci.* 2016. Vol. 100. P. 164–177.
- 10 Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Plokhotnichenko M. E., Dultseva G. G., Mazunina P. S. Excipient-free isoniazid aerosol administration in mice: evaporation-nucleation particle generation, pulmonary delivery and body distribution // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 563. P. 101–109.
- 11 Аньков С. В., Толстикова Т. Г., Валиулин С. В., Онищук А. А., Борисова М. С., Дубцов С. Н. Сравнительная фармакокинетика аэрозольной и пероральной форм пиразинамида // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2021. Т. 29, № 2. С. 229–232.
- 12 Hickey A. J., Durham P. G., Dharmadhikari A., Nardell E. A. Inhaled drug treatment for tuberculosis: past progress and future prospects // *J. Controlled Release.* 2016. Vol. 240. P. 127–134.
- 13 Giovagnoli S., Schoubben A., Ricci M. The long and winding road to inhaled TB therapy: not only the bug's fault // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2017. Vol. 43, No. 3. P. 347–363.
- 14 Misra A., Hickey A. J., Rossi C., Borchard G., Terada H., Makino K., Fourie P. B., Colombo P. Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis // *Tuberculosis.* 2011. Vol. 91, No. 1. P. 71–81.
- 15 Бажина А. А., Валиулин С. В., Бакланов А. М., Дубцов С. Н., Аньков С. В., Плохотниченко М. Е., Толстикова Т. Г., Онищук А. А. Метод генерации аэрозоля антибактериального лекарственного вещества цефазолина // *Оптика атмосферы и океана.* 2020. Т. 33, № 6. С. 459–462.
- 16 Valiulin S. V., Onischuk A. A., Dubtsov S. N., Baklanov A. M., An'kov S. V., Plokhotnichenko M. E., Tolstikova T. G., Dultseva G. G., Rusinov V. L., Charushin V. N., Fomin V. M. Aerosol inhalation delivery of triazavirin in mice: outlooks for advanced therapy against novel viral infections // *J. Pharm. Sci.* 2021. Vol. 110, No. 3. P. 1316–1322.
- 17 Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., An'kov S. V., Shkil N. N., Nefedova E. V., Plokhotnichenko M. E., Tolstikova T. G., Dolgov A. M., Dultseva G. G. Aerosol inhalation delivery of cefazolin in mice: pharmacokinetic measurements and antibacterial effect // *Int. J. Pharm.* 2021. Vol. 607. Art. 121013.
- 18 Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., An'kov S. V., Dubtsov S. N., Alekseev A. A., Shkil N. N., Nefedova E. V., Plokhotnichenko M. E., Tolstikova T. G., Dolgov A. M., Dultseva G. G. Aerosol inhalation delivery of ceftriaxone in mice: generation procedure, pharmacokinetics, and therapeutic outcome // *Antibiotics.* 2022. Vol. 11, No. 10. Art. 1305.
- 19 Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., Dultseva G. G., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Belogorodtsev S. N., Schwartz Ya. Sh. Studies of the specific activity of aerosolized isoniazid against tuberculosis in a mouse model // *Antibiotics.* 2022. Vol. 11, No. 11. Art. 1527.