

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО АНТИДОТА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА И
ЦИАНИДОВ НА ОСНОВЕ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С
ПСЕВДОПЕПТИДНЫМИ ЛИГАНДАМИ**

Давидович Ю.А.*, Вершинина Г.В.*, Гладких В.Д.*, Мелихова М.В.***, Лапина Н.В.**

**Федеральное государственное унитарное предприятие Научно-производственный центр*

Фармзащита Федерального медико-биологического агентства

141402, Россия, Московская область, г. Химки, Вахутинское шоссе, д. 11,

телефон +7 (495) 789-65-55, Gladkich2007@rambler.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт токсикологии

Федерального медико-биологического агентства

192019, Россия, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, телефон +7 (812) 365-06-80 ,

institute@toxicology.ru

Резюме

В настоящем сообщении обсуждаются полученные экспериментальные данные проведенной экспресс-оценки возможности создания антидота монооксида углерода и цианидов на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами. На примере кобальтового комплекса с аргинином экспериментально показана принципиальная возможность создания малотоксичного перорального антидота монооксида углерода и цианидов на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами.

Ключевые слова: антидот монооксида углерода и цианидов, токсичные продукты горения, ингаляционное воздействие.

**EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF CREATING A
PROPHYLACTIC ANTIDOTE OF CARBON MONOXIDE AND CYANIDES ON THE
BASIS OF METAL COMPLEX COMPOUNDS WITH PSEUDOPEPTIDE LIGANDS**

Davidovich Yu.A. *, Vershinina G.V. *, Gladkikh V.D. *, Melikhova M.V. **, Lapina N.V. **

***Federal State Unitary Enterprise Research & Production Center "Pharmaceutical Protection"*

of Federal Medical Biological Agency

141402, Khimki, Moscow region, Russia, telephone +7 (495) 789-65-55,

Gladkikh2007@rambler.ru

Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Toxicology of Federal Medical

Biological Agency

192019, St. Petersburg, ul. Bekhtereva, 1, telephone +7 (812) 365-06-80,

institute@toxicology.ru

Resume

This report discusses the experimental data obtained from a rapid assessment of the possibility of creating an antidote for carbon monoxide and cyanides based on metal-complex compounds with pseudopeptide ligands. Using the example of a cobalt complex with arginine, the principal possibility of creating a low-toxic oral antidote of carbon monoxide and cyanides based on metal-complex compounds with pseudopeptide ligands was experimentally shown.

Keyword: antidote of carbon monoxide and cyanides, toxic products of combustion, inhalation.

Введение

Более 80 % пострадавших при пожарах погибают в результате отравления продуктами горения, представляющими собой сложную смесь жидких и твердых аэрозолей, газов и паров, образующихся при пиролизе или термическом разложении [1-3]. Среди токсичных продуктов горения наибольшую опасность представляют монооксид углерода (CO) и цианиды (HCN), ингаляционное поражение которыми сопровождается развитием гипоксии и формированием острого энергетического дефицита при отсутствии характерного специфического (морфологического) субстрата отравления. Анализ концентрации карбоксигемоглобина и цианида в крови при смертельных исходах при пожарах свидетельствует о синергизме CO и HCN: их концентрации в крови пострадавших ниже, чем при изолированном отравлении токсикантами [4].

С учетом накопленного экспериментально-клинического материала, можно констатировать, что тактика лечения и профилактики ингаляционных поражений

MEDLINE.RU, ТОМ 20, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 24 ЯНВАРЯ 2019
токсичными продуктами горения должна основываться на прерывании патологического процесса, обусловленного токсичностью, прежде всего СО и HCN[5].

В настоящее время тактика лечения острых отравлений СО регламентируется соответствующим стандартом оказания медицинской помощи [6]. В соответствии с требованием стандарта, в догоспитальном периоде оказания экстренной медицинской помощи при токсическом действии окиси углерода показано проведение оксигенотерапии и введение антидота ацизол. Ацизол в значительной степени расширяет объем медицинской помощи при поражении токсичными продуктами горения на догоспитальном этапе, где практически отсутствует возможность применения гипербарической оксигенации [5].

Введение ацизола ускоряет процесс диссоциации карбоксигемоглобина и элиминации его с выдыхаемым воздухом, снижает потребность организма в кислороде и повышает устойчивость тканей к гипоксии органов, наиболее чувствительных к недостатку кислорода. В то же время ацизол не оказывает антидотного эффекта в отношении цианидов, так как цианиды нарушают утилизацию O₂ в тканях за счет ингибирования конечного звена цепи цитохромов клеточного дыхания.

Особенностью антидотной терапии при отравлении цианидами является наличие не одной, а нескольких групп антидотов с различным механизмом действия. Эффективность существующих антидотов не равнозначна, практически все они имеют более или менее серьезные побочные эффекты, поэтому при их клиническом применении необходим подтвержденный диагноз цианидной интоксикации, а для получения стойкого клинического эффекта – определенная последовательность их назначения [7].

Применительно к терапии отравлений цианидами, как токсичным компонентом продуктов горения при пожарах, в литературе неоднократно подчеркивалось о приоритетности использования кобальтсодержащих соединений, в частности гидроксикобаломина - наименее токсичного и более эффективного антидота цианидов [8, 9].

Оптимизация лечебно-организационных мероприятий при экстренной медицинской помощи и терапии острых отравлений токсичными компонентами горения при пожарах возможна на основе комбинированного применения антидотов СО и цианидов.

Вышеизложенное определяет актуальность прикладных научно-исследовательских работ, направленных на экспериментальную оценку возможности создания инновационного профилактического антидота монооксида углерода и цианидов.

В настоящем сообщении обсуждаются результаты экспериментальной оценки возможности создания антидота монооксида углерода и цианидов на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами.

Материалы и методы исследований.

При выполнении исследования использовались образцы субстанций, разработанных в НПЦ «Фармзащита» в качестве потенциальных антидотов монооксида углерода и цианидов:

- дигидрат диацета кобальт(II)ового комплекса N α -меркаптоацетил-L-аргинина (вещество № 1);
- 1,75 - Гидрат кобальт(II)ового комплекса N α -меркаптоацетил-L-метионина (вещество № 2);
- дигидрат кобальт(II)ового комплекса N α -меркаптоацетил-L-цистеина (вещество № 3);
- пентагидрат дикобальт(II)овой соли ди(карбоксиметил)меркапталя α -кетоглутаровой кислоты (вещество № 4);
- дигидрат комплекса триэтаноламина с кобальт(II)овой солью N-ацетил-L-цистеина (вещество № 5);
- внутримолекулярный комплекс триэтаноламина со смешанной кобальт(II)овой солью тиогликолевой и пировиноградной кислот (вещество № 6).

Эксперименты выполнены на белых беспородных половозрелых крысах, полученных из питомника РАМН «Рапполово» (Ленинградская обл.). Содержание и кормление животных осуществлялось в соответствии с Постановлением главного государственного санитарного врача РФ № 51 от 29.08.2014 Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Животные распределялись по группам случайным образом методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по весу тела ($\pm 5\%$). В конце эксперимента эвтаназия выживших животных осуществлялась в CO₂-камере.

Острую токсичность тестируемых образцов определяли при их внутрижелудочном введении лабораторным животным.

Моделирование ингаляционных отравлений СО осуществляли в условиях динамической затравки животных в ингаляционной камере из нержавеющей стали и кварцевого стекла объемом 100 л при принудительном газообмене. Объем воздуха на одно животное рассчитывали так, чтобы колебания концентрации кислорода в камере на

MEDLINE.RU, ТОМ 20, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 24 ЯНВАРЯ 2019

протяжении всего исследования не менялись более чем на 5%. Измерение параметров воздушной среды в ингаляционной камере контролировали в динамическом режиме газоанализаторами, термогигрометром и аппаратом для измерения скорости подаваемого в камеру воздуха. Перед началом исследования проводили отработку хроно-концентрационной модели воздействия СО с определением величин LCt_{50} и LCt_{99} , которые составили соответственно 7950 мг/м³ и 10 000 мг/м³.

Антицианидную активность тестируемых образцов субстанций оценивали на модели острого отравления цианистым калием (KCN) при внутримышечном введении животным в дозах LD_{50} и LD_{99} , составляющими соответственно 5 мг/кг и 8 мг/кг.

Экспресс-оценку антидотной активности исследуемых образцов субстанций проводили по критериям летальности, времени гибели животных, динамики симптоматики интоксикации и параметрам общего состояния животных. Период наблюдения составлял 7 суток.

Особенности фармакокинетики тестируемых образцов субстанций потенциальных антидотов исследовали с использованием разработанной методики измерения массовой концентрации кобальта в крови методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермическим способом атомизации. Препараты вводили крысам внутривенно в дозе 300 мг/кг. Динамику содержания кобальта в цельной крови отслеживали у каждого индивидуального животного. Построение градуировочной зависимости осуществляли с использованием растворов ионов кобальта с массовой концентрацией 4, 10, 20, 30, 40, 50 мкг/дм³. В качестве аналитического сигнала принималась площадь пика. Градуировочную характеристику считали приемлемой, если относительное стандартное отклонение аналитических сигналов для каждого градуировочного раствора не превышало 6 %. Контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляли перед анализом серии проб и через каждые 15-20 анализируемых проб. Градуировочные характеристики во всем диапазоне измеряемых концентраций характеризовались коэффициентом корреляции не менее 0,998.

Результаты и обсуждение. При однократном внутривенном воздействии тестируемые образцы исследованных субстанций потенциальных антидотов по параметрам острой токсичности (табл. 1) относятся к умеренно токсичным химическим веществам (III класс токсичности: $LD_{50} = 151-5000$ мг/кг) и малотоксичным химическим веществам (IV класс токсичности: $LD_{50} > 5000$ мг/кг) по ГОСТ 12.1.007-76.

Таблица 1 – Параметры острой токсичности исследованных образцов субстанций (б. крысы, внутривенно, мг/кг).

Субстанция	Значения токсикометрических характеристик		
	LD ₅₀	LDmin	LDmax
№ 1	3149,70	2990,98	3314,74
№ 2	>5000	—	—
№ 3	>5000	—	—
№ 4	1347,87	1159,77	1566,47
№ 5	>5000	—	—
№ 6	>5000	—	—

Гибель животных при внутрижелудочном введении субстанций №1 и №4 наблюдалась в течение первых суток от момента воздействия на фоне развивающейся симптоматики (гиподинамия, заторможенность, одышка, атаксия, кратковременные судороги в агональной стадии и паралича). У большинства переживших интоксикацию животных на максимальных дозах в первые сутки отмечались заторможенность, вялость, снижение потребления корма и воды. В дальнейшем каких-либо заметных нарушений состояния или поведения по сравнению с контролем не отмечалось на протяжении всего периода наблюдения.

Анализ результатов исследования особенностей фармакокинетики образцов субстанций при их внутрижелудочном введении (усредненная динамика концентрации кобальта в цельной крови крыс после введения препаратов в дозе 300 мг/кг отображена на рис.1; эти же концентрационные кривые в пересчете на одну и ту же дозу введенного кобальта 100 мг/кг представлены на рис.2) свидетельствует, что наибольшей биодоступностью обладает вещество №1 (быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта: высокие концентрации кобальта в крови отмечаются через 15 мин после введения, максимум концентрации - достигается через 1 час). Данное вещество характеризуется наибольшим значением AUC_t (площадь под кривой в интервале 0-4 час) и наиболее высокой концентрацией кобальта в крови (в пересчете на исходную дозу кобальта 100 мг/кг).

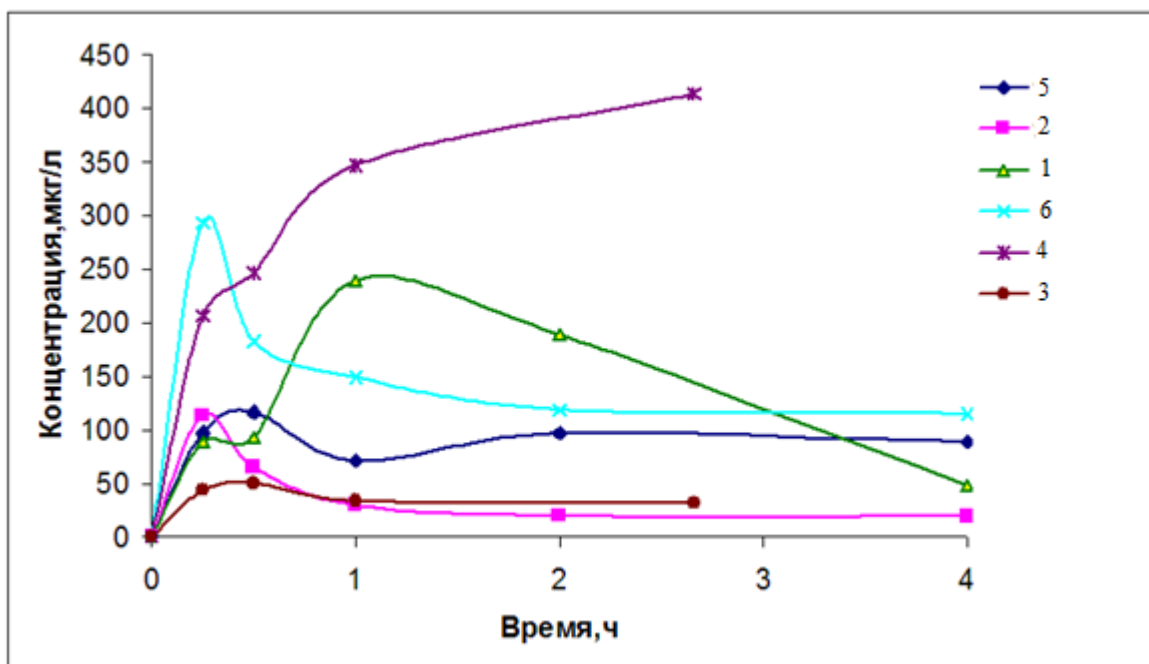


Рисунок 1. Динамика концентрации кобальта в крови крыс после введения препаратов в дозе по 300 мг/кг

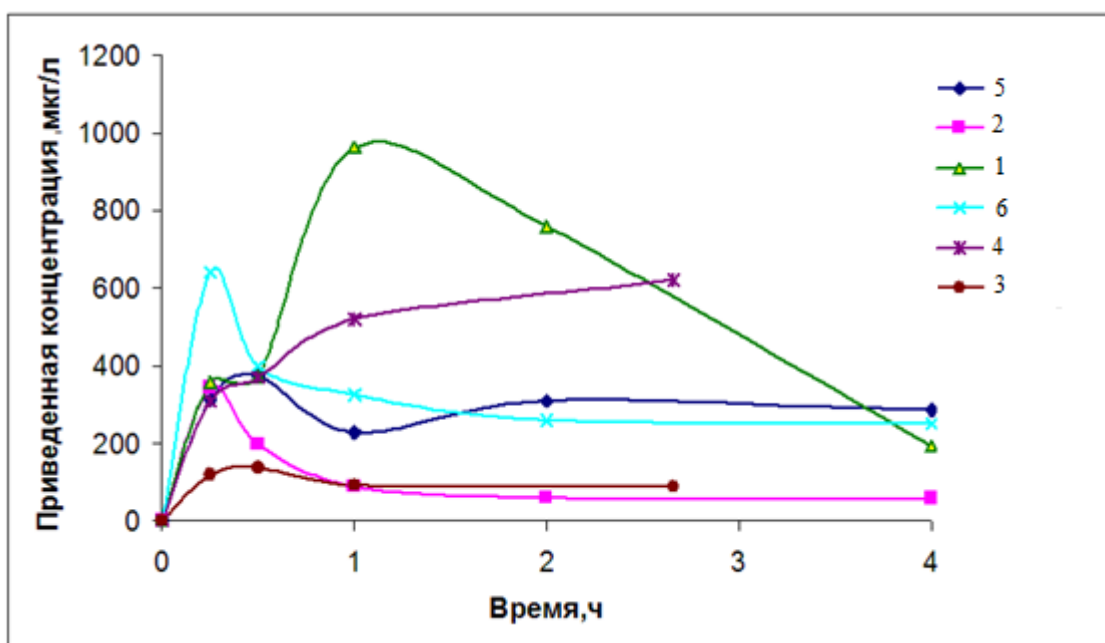


Рисунок 2. Расчетная концентрация кобальта в крови крыс, приведенная к одинаковой дозе введенного кобальта 100 мг/кг

Выраженной биодоступностью характеризуется также вещество № 4, которое быстро всасывается и поддерживает высокую концентрацию кобальта в крови более 3 часов.

Вещество № 6 характеризуется наиболее быстрым всасыванием (максимум концентрации достигается через 15 мин), однако оно более чем в 2 раза уступает двум выше упомянутым препаратам по интегральной биодоступности (меньшие значения показателя AUCt).

Остальные из исследованных препаратов (№ 2, № 3, № 5) отличаются относительно менее выраженной биодоступностью.

Результаты экспресс-оценки антидотной эффективности образцов исследуемых субстанций при ингаляционной заправке животных монооксидом углерода на уровне летальных доз ($LC_{t50} = 7950 \text{ мг/м}^3$, $LC_{t99} = 10\,000 \text{ мг/м}^3$), свидетельствуют, что с момента подачи в камеру СО, крысы начинали беспокоиться и принохиваться. На 5-7 минуте у животных появлялась саливация, затем одышка и адинамия. На 9-10 минуте крысы ложились на дно клеток и не реагировали на внешние раздражители. К 7-12 минуте у всех животных были зафиксированы судороги, сила и время появления которых, зависела от концентрации СО. Гибель наступала на 12-17 минуте на фоне судорог и последующей остановки дыхания. Крысы, пережившие 17 минутное воздействие СО спустя 5-10 минут начинали передвигаться, а через 15-30 минут общее состояние животных было удовлетворительным. На следующий день после воздействия СО общее состояние животных экспериментальных групп не отличались от контроля.

Клиническая картина у животных, которым с профилактической целью (за 5-30 мин до заправки) вводили субстанции потенциальных антидотов, характеризовалась отсутствием судорог у части животных (до 80%), быстрой нормализацией дыхания. В большинстве случаев у них наблюдалась лишь гиподинамия и незначительная одышка. В ряде случаев (до 30%) фиксировалась отсроченная гибель. На 7 сутки исследования общее состояние животных опытных групп не отличались от животных интактной группы.

Выживаемость животных при профилактическом (за 15 и 30 мин до заправки) введении тестируемых субстанций составила от 10 до 40%.

При воздействии СО в дозе LC_{t99} (10000 мг/м^3) и профилактическом (за 15 и 30 мин) введении субстанций в дозе 600 мг/кг антидотная активность исследованных субстанций располагаются (в порядке убывания) в следующем порядке: вещество №6 > вещество №1 > вещество №4. Снижение дозы вводимой субстанции до 300 мг/кг практически не влияло на выживаемость животных в случае профилактического введения (за 15 мин до ингаляционной заправки СО на уровне LC_{t99}).

Анализ экспериментальных данных, полученных при экспресс-оценке антицианидной активности образцов тестируемых субстанций, свидетельствует, что при отравлении животных KCN в дозе LD_{50} развитие симптомов интоксикации фиксировалось

MEDLINE.RU, ТОМ 20, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 24 ЯНВАРЯ 2019
через 2-3 минуты. У крыс отмечалось ярко-розовое окрашивание ушей, хвоста, лап, покраснение конъюнктивы, расширение зрачков. Далее у животных наблюдалось запрокидывание головы, одышка, повышался тонус мышц-разгибателей, появлялся тризм жевательной мускулатуры. В период судорог интенсивность розового окрашивания слизистых и кожного покрова нарастала. Судороги носили тонический характер и переходили на высоте развития в опистотонус. Гибель животных наступала через 10-12 минут после введения токсиканта.

При поражении на уровне LD_{99} начальная стадия быстро переходила в диспноэтическую, затем в судорожную и паралитическую. Гибель животных наступала в течение 4-8 минут.

Профилактическое введение образцов субстанций №1 и №4 в дозе 300 мг/кг за 15 мин и в дозе 600 мг/кг за 30 мин до воздействия медианно-смертельных доз KCN полностью предотвращало гибель животных. При воздействии KCN в дозе LD_{99} выживаемость животных составила 30-40%.

Выводы. На примере кобальтового комплекса с аргинином экспериментально показана принципиальная возможность создания малотоксичного перорального антидота монооксида углерода и цианидов на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами.

Литература.

1. Alarie Y. Toxicity of fire smoke /Alarie Y. // Crit. Rev. Toxicol. — 2002. — 32. — 259–89.
2. Linden C. H. Smoke inhalation // Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, 4th edn. / Linden C. H. , W. M. Shannon, S. W. Borron, and M. J. Burns (eds.).Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007. — P. 1283–95.
3. Stefanidou M. Health impacts offire smoke inhalation / Stefanidou M., Athanaselsis S., Spiliopoulou C. // Inhal. Toxicol. — 2008. — 20. — 761–6.
4. Levin B. C. Analysis of carboxyhemoglobin and cyanide in blood fromvictims of the Dupont Plaza Hotel fire in Puerto Rico / Levin B. C., Rechani P. R., Gurman J. L., et al. // J. Forens. Sci. — 1990. — 35. — 151–68.
5. Антисдотная терапия отравлений высокотоксичными веществами в условиях чрезвычайных ситуаций. Руководство /под ред. В.Д. Гладких, С.Х. Сарманаева, Ю.Н. Остапенко. М.: Комментарий, 2014. -272 с.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24 декабря 2012г. №1393н "Об утверждении стандарта скорой медицинской помощи при отравлениях окисью углерода, другими газами, дымами и парами»/
7. Hall A. H. Which cyanide antidote? / Hall A. H., Sakers J., Baud F. // Crit. Rev. Toxicol. — 2009. — 39. — 541–52.
8. Fortin J.-L. Prehospitaladministration of hydroxocobalamin for smoke inhalationassociatedcyanide poisoning: 8 years of experience in the ParisFire Brigade / Fortin J.-L., Giocanti J. P., Ruttimann M., Kowalski J. J. // Clin. Toxicol. — 2006. — 44 (Suppl. 1). — 37–44.
9. Borron S. W. Prospectivestudy of hydroxocobalamin for acute cyanide poisoning in smokeinhalation / Borron S. W., Baud F. J., Barriot P., Imbert M., Bismuth C. // Ann. Emerg. Med. — 2007a. — 49. — 794–801.

Статья опубликована в журнале Medline.ru, том 20, ст.8 2019 год.